Med 38

Aus der tropenhygienischen Abteilung (Prof. Lippelt)
des Bernhard-Nocht-Institutes für Schiffs- und Tropenkrankheiten
zu Hamburg
Direktor: Prof. Dr. med., Dr. med. vet. h. c. E. G. Nauck

Zur Immunologie der Borrelien

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Wilhelm Vinke
aus Berlin

Hamburg
~~1960~~ 1961

Druck von Gg. Nolte in Marburg

Aus der tropenhygienischen Abteilung (Prof. Lippelt)
des Bernhard-Nocht-Institutes für Schiffs- und Tropenkrankheiten
zu Hamburg
Direktor: Prof. Dr. med., Dr. med. vet. h. c. E. G. Nauck

Zur Immunologie der Borrelien

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Wilhelm Vinke
aus Berlin

Hamburg
1960

Druck von Gg. Nolte in Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am : 13.3.1961

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Dekan	:	Prof. Dr. Prévôt
Referent	:	Prof. Dr. Lippelt
Korreferent	:	Prof. Dr. Dr. Nauck

MEINEN LIEBEN ELTERN

Inhaltsverzeichnis

I. Historischer Überblick

II. Die serologischen und immunologischen Fragestellungen, Methoden und Ergebnisse der Literatur.

1) Methoden :

a) Schutzversuch
b) Pfeiffer'sches Phänomen
c) Kreuzimmunitätstest
d) Lysine
e) Opsonine
f) Thrombocytobarine
g) Agglutinine
h) Immobilisine
i) Komplementbindungsreaktion

2) Zusammenfassung der in der Literatur berichteten Ergebnisse.

III. Eigene Untersuchungen.

1) Methodik

a) Der Stamm
b) Antigenherstellung
c) Herstellung eines Hyperimmunserums
d) Technik der Komplementbindungsreaktion

2) Ergebnisse

a) Ergebnisse der Antigenauswertungen im Blocktest
b) Ergebnisse der Untersuchungen von Mäuseseren
c) Ergebnisse der Untersuchung von menschlichen Seren
d) Verlauf der Bildung der komplementbindenden Antikörper nach künstlicher Immunisierung eines Kaninchens

IV. Diskussion

V. Zusammenfassung

VI. Literaturverzeichnis

1. Historischer Überblick

Das Rückfallfieber ist eine von Insekten übertragene und von Spirochaeten verursachte, akute Infektionskrankheit, die durch wiederholte Fieberschübe gekennzeichnet ist. Die "Rückfälle" von mehrtägiger Dauer wechseln mit afebrilen Intervallen ab, so daß die Fieberkurve als pathognomonisch für den klinischen Verlauf anzusehen ist. (Nauck 163, Lippelt 135).

Der Erreger wurde erstmalig von Obermeier (181) im Jahre 1868 nachgewiesen. Während einer Epidemie in Schlesien beobachtete Obermeier im Blut eines fiebernden Kranken ein lebhaft bewegliches, fadenförmiges Gebilde. Erst nach einer zweiten, gleichen Beobachtung an der Berliner Charité 1873 entschloß er sich zur Publikation. Er nannte den Erreger "Spirillum febris recurrentis". Diese Entdeckung kann nicht hoch genug bewertet werden. Zum ersten Mal wurde hiermit die Theorie einer bakteriellen Genese der Infektionskrankheiten aufgestellt und bewiesen. Das führte zur Entdeckung vieler weiterer Parasiten und somit zur Klärung der Ätiologie vieler Krankheiten (Lippelt 134). Dieser von Obermeier beschriebene Erreger des Rückfallfiebers gehört zu der Ordnung der Spirochaetales. Heute ist für die Rückfallfieber-Spirochaeten der Gattungsname "Borrelia" üblich geworden.

Die Übertragung der Borrelien findet meist nicht durch einfachen Kontakt, sondern durch Zwischenträger-Läuse und Zecken - statt. Schon Livingstone (136) hatte 1857 bemerkt, daß Zeckenbisse manchmal von Fieber gefolgt wurden. Allerdings war ihm die Pathogenese dieses Fiebers nicht bekannt. Nabarro 1903 (161), Cook (54) und Ross - Milne 1905 (202) wiesen Spirochaeten im Blut von Afrikanern in Uganda nach. Aber erst Dutton und Todd (68) gelang 1905 der Nachweis, daß die Krankheit von einer Spirochaete, deren Überträger Ornithodorus moubata war, erzeugt wurde. Noch im gleichen Jahr studierte Koch (119) den Lebenszyklus der Spirochaeten in der Zecke und konnte darüber auch die hereditäre Übertragung feststellen.

Die Rolle der Laus als Reservoir für Rekurrens-Spirochaeten wurde von Mackie 1907 (139) in Indien und Smith 1909 (217) in Ägypten erkannt. Sergent und Foley (210, 211) gelang 1908 die Übertragung des Rückfallfiebers mit Läusen, die sie an Patienten gefüttert hatten, auf einen Affen. Nicolle et al (165, 166, 168, 169) reproduzierten diese Ergebnisse. Da sich die Borrelien-Stämme weder morphologisch noch sero-

logisch (s.u.) einwandfrei differenzieren ließen, wurde eine Einteilung nach den verschiedenen Vektoren vorgenommen. Der von der Laus-Pediculus humanus übertragene Stamm des europäischen Rückfallfiebers wurde Borrelia recurrentis, sive obermeieri, benannt. Die Borrelien der tropischen und subtropischen Rückfallfieber wurden nach den übertragenden Lederzecken der Gattung Ornithodorus unterteilt.

Als Beispiele seien angeführt :

Name der Zecke	Stamm	Vorkommen
Ornithodorus moubata	Borrelia duttoni	Afrika
" tholozani	" persica	vord. Orient
" erraticus	" hispanica	Spanien, Nordafrika
" hermsi	" novyi	Kalifornien
" turicata	" turicata	Mexiko, Texas

Während die verschiedenen Zeckenrückfallfieber, entsprechend der begrenzten Verbreitung der speziellen Zecken, nur in geographisch umschriebenen Räumen endemisch vorkommen, ist das Läuserückfallfieber ein Kosmopolit und verursacht Epidemien.

Die globale Verbreitung des Rückfallfiebers ist schon seit dem 17. u. 18. Jahrhundert bekannt. So stammt die erste Beschreibung des Rückfallfiebers in Nordafrika aus der Zeit Napoleons von seinem Chirurgen (Martini 149). Größere Bedeutung in Europa erlangte der irisch-großbritannische Herd. 1727-29 wütete eine mörderische Epidemie, die in Gloucestershire ganze Familien und Dörfer ausrottete (Creighton 53). Von diesem Herd gingen im 18. und 19. Jahrhundert immer wieder neue Epidemien aus, die auch teilweise auf das Festland übersprangen (Martini 150). Von Craigie und Henderson wird bei einem Ausbruch in Edinburgh der Name "Relapsing Fever" eingeführt, der den Verlauf der Krankheit charakterisiert. (Sparrow 221, Lippelt 134). Durch Auswanderer aus Liverpool wird die Krankheit nach Amerika gebracht, wo sie 1844 in Philadelphia (Topley u. Wilson 232) und 1869 in Boston (Martini 149) ausbricht.

In Deutschland trat das Rückfallfieber 1846 - 57 in Oberschlesien auf und war wohl von Rußland eingeschleppt worden (Dümmler 66, Virchow 241). Die Zahl der Fälle stieg während der Jahre 1868 - 72 und 1879 an (Lippelt 134). Diese Epidemie dürfte im Zusammenhang mit dem russisch-türkischen Krieg stehen, bei dem 3775 russische Soldaten an Rückfallfieber starben.

Von der Verbreitung der Krankheit nach der Jahrhundertwende möge einiges Zahlenmaterial (Martini 149 , Sparrow 221) einen Eindruck vermitteln :

Nordafrika wird 1912 - 1915 von einer Epidemie heimgesucht. Während des ersten Weltkrieges ist das Rückfallfieber in vielen, an dem Krieg beteiligten Ländern, besonders aber in Osteuropa zu finden. Aus Serbien werden hohe Morbiditätsziffern berichtet. Entlausungsmaßnahmen ganzer Truppenteile können Schlimmeres verhüten, so daß im deutschen Heer nur 2000 Erkrankungen gezählt werden. In Rußland führte erst die Auflösung der Armee und die Revolution zu einer großen Krankheitswelle. 1919 - 1923 wurden in Rußland 6 450 121, im übrigen Europa 3 768 367 Fälle gezählt.

Über die Erkrankungen von 1920 - 1930 in West- und Äquatorial-Afrika liegen größtenteils nur Schätzungen vor. Für 1921 - 1922 wird die Zahl der Fälle im Sudan und im Gebiet des Nigers auf 80 - 100 000 geschätzt. In einem Sudan-Distrikt starben von 45 000 Einwohnern 10 000 allein im Jahr 1926 (Atkey 15). In manchen Orten raffte die Krankheit 37 % bis 41 % der Bevölkerung hin.

Weitere hohe Erkrankungszahlen wurden verzeichnet :

1943 - 46	Tunesien	400 000	Fälle
	Algerien	432 000	"
	Marokko	180 000	"
1943 - 45	Anglo-Ägypt. Sudan	52 000	"
1945 - 46	Ägypten	1 287 760	"
1947 - 48	Nigeria	4 000	"
1949 - 54	Äthiopien	23 687	"

1944 - 47	China	57 282	Fälle
1945 - 47	Persien	70 000	"
1946 -	Rumänien	13 400	"

In Tunesien waren es 20 %, in Algerien 5,4 %, in Marokko 2,25 %, in Ägypten 8 % der Bevölkerung, die in den Jahren 1943 - 46 erkrankten (s. Tabelle). Die Mortalität lag zwischen 5 % und 10 % (Gaud und Morgan 81).

Seit man in der Lage ist, Insekticide und Antibiotica im Kampf gegen das Rückfallfieber einzusetzen, verringerten sich die Erkrankungszahlen und besserte sich die Prognose.

Bei den Insekticiden dürfte das Gammexan dem DDT überlegen sein (Kalra und Jacob 113). Von den einzelnen Autoren werden unterschiedliche Gebrauchsanwendungen beschrieben, die zwischen 100 und 600 mg Dosen je Quadratfuß liegen. Eine mehrmalige Anwendung ist einer einzigen großen Dosis an Wirkung überlegen (Jepson 110, Annecke 8, Anderson 6, Heisch und Furlong 97, Lovett 138).

Von den Antibiotica wurde zuerst Penicillin in die Therapie eingeführt (Taft u. Pike 231, Lourie u. Collier 137, Greaves etal. 94, Tucker 236, Schuhardt u. Hemphill 229, Anderson 4, Ingraham u. Lapenta 104, Heisch 96). Bei Erkrankungen mit Läuserückfallfieber erwies sich jedoch Chloramphenicol, 1 g in 4 Dosen von je 250 mg, als Mittel der Wahl (Hirschboeck 101). Auch beim Zeckenrückfallfieber zeigten sich die anderen Antibiotica, wie Aureomycin (Reimers 195, Yeo 251, Trowell 235, Gimeno De Sande 88, Mazotti 152, Juarez et al. 111), Terramycin (Charmot et al. 45, Gefel u. Rubenow 82), Chloramphenicol (Falcone 45) Streptomycin (Narain u. Kalra 162) dem Penicillin überlegen.

Durch Anwendung der Insekticide und durch die erfolgreiche Antibiotica-Therapie kann das epidemische Auftreten von Rückfallfieber verhindert werden. In den letzten 10 Jahren wurden nur noch kleinere endemische Ausbrüche beobachtet. Panama, Mexiko und mindestens 10 Staaten der USA melden noch immer Erkrankungen. Die bedeutendsten Herde in Afrika sind heute Tunesien, Algerien, Marokko, Ägypten, Äthiopien, Tanganyika, Kenya, der Sudan und das Kongo-Gebiet.

In Spanien dagegen wurde die Zahl der Fälle allein für das Jahr 1951 auf 5 000 geschätzt (Gimeno De Sande 88). Aber auch in Osteuropa, in den Balkanstaaten und der UdSSR ist das Rückfallfieber noch heute anzutreffen. Außer relativ hohen Morbiditätsziffern in China und Persien werden auch in Indien, der Türkei und den arabischen Staaten weiterhin Erkrankungen festgestellt. Not und Elend, soziale Mißstände und Kriegszeiten können natürlich zu neuen Ausbrüchen des Rückfallfiebers führen, wie das Beispiel des Koreakrieges in jüngster Vergangenheit gezeigt hat (Anderson u. Zimmermann 7, Zimmerman 253). Allgemein wird aber nur mehr mit sporadischem Auftreten der Krankheit gerechnet werden können.

Den objektiven Methoden zur Sicherung der Diagnose sind nur begrenzte Möglichkeiten geboten. Am einfachsten und gebräuchlichsten ist der mikroskopische Nachweis der Erreger im Blutausstrich, bzw. noch besser im "dicken Tropfen", nach Giemsa gefärbt. Man hat hierbei jedoch darauf zu achten, daß das Blut z.Zt. des Temperaturanstiegs entnommen wird : Nur dann ist der Erreger in großer Anzahl im peripheren Blut vorhanden, während er im Fieberabfall aus diesem schon weitgehend verschwunden sein kann. Eine empfindlichere Nachweismethode ist der Tierversuch. Das Versuchstier wird mit Patientenblut infiziert und das Auftreten einer Spirochaetömie im dicken Tropfen kontrolliert. Mit dieser Methode gelingt der Erregernachweis auch dann, wenn nur eine kleine Anzahl von Borrelien im peripheren Blut des Kranken vorhanden ist. Allerdings ist die Tierpathogenität der einzelnen Borrelien-Stämme verschieden, was bei der Ausführung eines Tierversuches berücksichtigt werden muß. So sind z.B. Borrelia hispanica und Borrelia persica für das Meerschweinchen pathogen, während sich Borrelia duttoni im Meerschweinchen nicht vermehrt (Baltazard et al.20). Weiterhin ist die Xenodiagnose zu erwähnen. Die Borrelien werden in Läusen bzw. Zecken, die an Patienten gefüttert wurden, nachgewiesen. Gestützt auf die Theorie einer strengen Spezifität der verschiedenen Ornithodori für die entsprechenden Borrelien (Brumpt 33, Davis 61, 63, Davis u. Hoogstraal 62, Baltazard et al 21) hat man diese Methode hauptsächlich zur genaueren Differenzierung der verschiedenen Rückfallfieberstämme angewandt. Die Ergebnisse werden jedoch in Frage gezogen, da neueren Untersuchungen zufolge eine Spezifität in diesem strengen Sinne nicht zu bestehen scheint.

Rafyiet al.(191) hat bewiesen, daß ein Stamm von mehreren Zeckenarten übertragen werden kann. Darüber hinaus konnten Heisch et al.(98) Sparrow (219,220), Moser & Weyer (158) Weyer & Moser (245) zeigen, daß Läuse auch für Zeckenstämme empfänglich sind und diese übertragen können.

Alle angeführten Methoden beziehen sich auf den Erregernachweis. Sie sind im Intervall und nach Ablauf der Krankheit nicht verwertbar, da der Erreger nur während des Fieberanfalls im peripheren Blut erscheint. Aus diesen Gründen hat es nicht an Versuchen gefehlt, die Serologie für die Diagnostik nutzbar zu machen.

II. Die serologischen und immunologischen Fragestellungen. Methoden und Ergebnisse der Literatur.

Nachdem schon mit den ersten Beobachtungen von Obermeier (181) das Auftreten und Wiederverschwinden von Borrelien im Blut als charakteristisch für den Vermehrungscyklus dieser Krankheitserreger erkannt wurde, versuchten Metchnikoff (155, 156, 157) und Gabritschewsky (73, 74, 75, 76, 77, 78, 79) als erste in den Jahren vor der Jahrhundertwende den Mechanismus der Krisis zu klären. Metchnikoff, wie auch Cantacuzene (43) und Bardach (26), sahen die Phagocytose der Erreger als alleinige Ursache für die Auflösung und das Verschwinden der Spirochaeten an. Gabritschewsky dagegen glaubte auf Grund seiner experimentellen Untersuchungen, daß zunächst humoral wirksame Stoffe auf die Borrelien baktericid bzw. in Form einer Lysis wirken und die Krisis verursachen, während die Phagocytose für die Borrelien lediglich die Bedeutung eines "Totengrabes" habe.
Schon bald setzte sich die Auffassung von Gabritschewsky durch, die durch die Untersuchungen von Novy & Knapp (180), Uhlenhuth & Haendel (242) und Manteufel (140) bestätigt wurde.

Mit der Einführung moderner serologischer Methoden und der zunehmenden Kenntnis über den Mechanismus immunologischer Vorgänge wurde in der Folgezeit versucht, eine Reihe von Fragen, die mit dem Vermehrungs-

cyklus, einer spezifischen Immunität und der Typisierung von Borrelien im Zusammenhang stehen, zu klären.

Bereits bei den ersten experimentellen Arbeiten zeigte sich, daß die Spirochaeten des ersten Anfalls (1.Spirochaetaemie) und des Rückfalls (2.Spirochaetaemie, nach dem Intervall) eine verschiedene antigene Struktur haben, was mit den meisten zur Verfügung stehenden serologischen Methoden nachgewiesen werden konnte. Die Spirochaeten des ersten und zweiten Rückfalls usw. wurden entsprechend als erste und zweite "Rezidivrasse" bezeichnet.

Im einzelnen wurde hauptsächlich untersucht und diskutiert :

I.) Die Differenzierung von Borrelien-Spezies mit Hilfe serologischer Methoden;

II.) Die Entstehung des Rückfallphänomens ;

III.) Das Auftreten, die Dauer und die Art der Immunität ;

IV.) Die routinemäßige Verwertbarkeit serologisch-immunologischer Methoden für die Diagnostik.

Zur Klärung dieser Fragen wurden die verschiedensten serologischen Methoden, wie der Nachweis von Lysinen, Agglutininen, komplementbindenden Antikörpern usw. angewandt.

M e t h o d e n :

a) Schutzversuch :

Ein natürlich oder experimentell mit Borrelien infiziertes Versuchstier wird nach Ablauf der Infektion mit dem homologen Stamm reinfiziert. Man kontrolliert, ob die "Inkubationszeit" verlängert, die Infektion angeschwächt wird oder völlig ausbleibt. Die Dauer der Schutzkraft des Immunserums und dessen Stärke können so bestimmt werden. (Novy & Knapp 180), (Kusonoki 122, Sergent & Foley 213, Jancso 109, Weichbrodt 244, Toyo-

da 233, Kudicke et al. 121, Prigge 189, Steiner & Steinfeld 225, Nicolle & Anderson 171, Mathis 142, Brussin & Schapiro 37, Meleney 153, Bruynoghe & Dubois 41, Heronimus 100, Sagel 209, Kritschewski & Rubinstein 125, Kirk 118, Anderson et al. 5, Baltazard et al. 23, Heisch 96).

Dieser Versuch kann auch so ausgeführt werden, daß ein normales Testtier ein- oder mehrmals passiv immunisiert wird, ehe es mit dem entsprechenden Stamm infiziert wird. (Nicolle & Blaizot 167, Novy & Knapp 180, Hoffmann 102, Prigge & Rothermundt 190, Robertson 199, Coleman 50,51,52). Für die Permanenz der Antikörper im Blut sprechen die Untersuchungen von Nohira (178, 179), Remlinger & Bailly (197) und Russel (205), die transplacentare Übertragung von Lysinen mit Hilfe des Schutzversuches nachgewiesen haben.

b) Pfeiffer'sches Phänomen :

Die Originalmethode von Pfeifer stellte den Nachweis von Bakteriolysinen gegen Vibrio comma in vivo dar. Die Bakteriolyse tritt nach der von dem immunisierten Versuchstier zur Ausbildung der Immunität benötigten Zeit (4-6 Wochen), im Peritonealexsudat kurz nach ip. Injektion des homologen Stammes ein. Bei Versuchen, eine analoge Reaktion in vitro ablaufen zu lassen, zeigte sich, daß zum Zustandekommen einer Bakteriolyse ein unspezifischer thermolabiler Serumbestandteil - Das Komplement (Ehrlich) - notwendig ist. Falls nämlich das zu untersuchende Serum durch Erhitzen auf 56°C "inaktiviert" (=Zerstörung des Komplements) worden ist, muß das Komplement durch Zufügen von frischem unerhitztem Serum wieder zugesetzt werden, d.h., die lysierende Wirkung eines derartigen Antikörpers muß durch einen unspezifischen Serumbestandteil "komplettiert" werden.

Laufen derartige Reaktionen in vitro ohne Zusatz von Komplement ab, so werden sie als Neutralisationstests bezeichnet. Dabei wird im

allgemeinen inaktiviertes Serum mit einer Erregersuspension gemischt und nach einer "Incubationszeit" von 3-5 Stunden / 37°C das Gemisch einem empfänglichen Tier injiziert.
Diese Methode dient dem Nachweis neutralisierender Antikörper. Durch Konzentrationsabstufungen des Serums oder der Erregersuspension kann eine quantitative Aussage über die neutralisierende Fähigkeit eines Serums gemacht werden. Nach heutiger Anschauung bietet der Nachweis neutralisierender Antikörper einen sehr guten Einblick in die Immunitätslage von Mensch und Tier. Die Bezeichnung "Pfeiffer'sches Phänomen" sollte jedoch in vivo-Reaktionen unter Mitwirkung von Komplement vorbehalten bleiben.

Mit dem Pfeiffer'schen Versuch, Modifikationen dieser Reaktion und auch mit dem Neutralisationstest wurde versucht, Borrelienstämme zu typisieren und das Rückfallphänomen (s. unten) zu klären. (Novy & Knapp 180, Uhlenhuth & Haendel 242, Kolle & Schatiloff 120, Manteufel 140, Jancso 109, Toyota 234, Weichbrodt 244, Kudicke et al. 121, Toyoda 233, Reiter 196, Steiner & Steinfeld 224, 225, Strempel & Armuzzi 226, Plaut 185, Sagel 208, Strempel 228, Prigge & Rothermundt 190, Robertson 199, Kempt et al. 115, Beck 27, Sergent 216). Die Ergebnisse sind widersprechend und der Pfeiffer'sche Versuch konnte sich als Reaktionsprinzip nicht durchsetzen. Immerhin konnten Plaut (186) und Plaut & Grabow (187) mit dieser Methode die Bildung von lysierenden Antikörpern im Verlauf der Krankheit verfolgen. Die Lysine ließen sich erst in der 3. Woche post infectionem nachweisen. Nach der 7. Woche fiel ihr Titer wieder ab.

c) Kreuzimmunitätstest :

Mit der gleichen Methodik wie beim Schutzversuch werden im Kreuzimmunitätstest die Reaktionen zwischen heterologen Stämmen geprüft. Übereinstimmend konnte beobachtet werden, daß dieser Test in der Lage ist, streng spezifisch antigenetische Unterschiede nicht nur zwischen verschiedenen Borrelien-Spezies, sondern sogar "intra speciem" anzuzeigen. (Uhlenhuth & Haen-

del 242, Gleitsman 89, Nicolle et al. 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, Mathis 143, 144, 145, 146, Sagel 207,209, Manteufel 140, Jancso 109, Kudicke et al.121, Gori 90, Toyota 234, Kroo 126, Rubinstein & Kapusto 203, Mathis & Durieux 147, Sergent 214, Baltazard 22, Beck 27, Adler &Ashbel 30, Ashbel 14, Rafyi & Maghami 191, Pickoul 184, Brumpt 33, Brumpt & Brumpt 24, Anderson et al.5, Baltazard et al.23, Heisch et al.96, 98, 99, Dubois 64,65, Geigy & Burgdorfer 86).

d) Lysine:

Hierbei handelt es sich um Antikörper, die in vitro eine Auflösung von Mikroorganismen bewirken. Die zu untersuchenden Seren werden in fallenden Verdünnungen mit Spirochaeten-Suspensionen gemischt ; nach einer Reaktionszeit von 1/2 - 2 Stunden bei Temperaturen von 22° bis 41°C wird ein Tropfen auf einen Objektträger gebracht und die Reaktion im Dunkelfeld abgelesen. (Aoki 9, Toyoda 233, Sergent et al.212, Aristowsky & Wainstein 12,13, Wainstein 243, Jakimow 106, Cuboni 55, Russel 204, 205, 206, Ackermannl, Balteanu et al.24, 25, Pfister 183, Schuhardt 230, Gel'tt ser 87) oder im nach Giemsa gefärbten dicken Tropfen (Toyoda 233, Ballif et al.16, Pfister 183) abgelesen. Bei positivem Ausfall wird eine Auflösung der Erreger beobachtet. Als Antigen wurden Aufschwemmungen von Kultur-Spirochaeten (Wainstein) spirochaetenhaltiges Serum (Russel, Schuhardt) oder Blut (Ballif, Aoki, Pfister) gebraucht. Bei der Verwendung abgestufter Serummengen ist es möglich, den "Serumtiter" von Lysinen im Verlauf einer Infektion zu studieren (Wainstein 243, Russel 206, Schuhardt 230). Durch verschiedene Titerhöhen gegen die Ausgangs- und die Rezidivrassen konnten Beziehungen zwischen dem Rückfallphänomen und dem Auftreten rassenspezifischer Lysine aufgezeigt werden.

e) Opsonine :

Eine andere Form von Antikörpern stellen die sogenannten Opsonine dar, die in der Lage sein sollen, die phagocytäre Tätigkeit der Leukocyten anzuregen oder zu erhöhen. Levaditi & Roché (128, 129) untersuchten ihr Auftreten bei Rückfallfieber mit der Methode nach Wright : Serum immunisierter Tiere wird mit gewaschenen Leukocyten gemischt und einer Suspension mit spirochaeten-haltigem Mäuseblut versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 40 Minuten/37°C wird der Grad der Phagocytose abgelesen und in Prozent angegeben. Serum, das 40 Std. nach der Krisis entnommen worden war, zeigte eine deutliche Phagocytose. Die Opsonine erwiesen sich als "rassenspezifisch", da das Serum aus dem ersten Intervall die Spirochaeten der Rezidivrasse nicht angriff (s.u.). Erhitzen des Serums 40 Minuten/60°C beeinflußte die Opsonin-Wirkung nicht.

f) Thrombocytobarine :

Rieckenberg konnte im Verlauf von Trypanosomen-Infektionen sogenannte "Thrombocytobarine" nachweisen. (Rieckenberg'sches Phänomen, Beladungsphänomen). Unter dem Einfluß derartiger Thrombocytobarine werden Trypanosomen mit Thrombocyten beladen. In Anlehnung an diese Beobachtungen arbeitete Brussin (39) eine Methode aus, mit der Thrombocytobarine im Serum von mit Borrelien immunisierten oder infizierten Tieren nachgewiesen werden konnten. Dabei müssen als Reaktionsgemisch ein Immunserum, lebende Borrelien als Antigen und Thrombocyten als Indikator benutzt werden. (Originalmethode von Brussin : Immunserum - 3 Tropfen Blut einer immunisierten Maus, Antigen = 2 Tropfen borrelienhaltiges Blut mit 3 Tropfen 2%iger Zitratbouillon zur Gerinnungsverhinderung, Thrombocyten wurden nicht gesondert zugesetzt). Nach einer Reaktionszeit 15 Minuten/37° C wird ein Tropfen entnommen und im Dunkelfeld beobachtet. Bei positiven Ausfall der Reaktion sieht man, daß jede Borrelie mit einer großen Anzahl von Thrombocyten beladen, bzw. die Oberfläche der Borrelien mit Thrombocyten verklebt ist.

Krantz (123) modifizierte diese Methode. Um die bei der Beobachtung der Reaktion störenden Erythrocyten und Leukocyten zu entfernen, suspendierte er Blut infizierter Mäuse in physiologischer Na Cl. Nach der Gerinnung wurde die Mischung zentrifugiert und der spirochaetenhaltige Überstand als Antigen verwandt.

Dieses wurde mit dem Serum immunisierter Tiere gemischt und als Indikator Thrombocyten normaler Tiere oder auch zerriebene Bakterien, welche ebenfalls auf den Borrelien verkleben, zugesetzt. Aristowsky & Schaechter (11) fügten frisches Meerschweinchenserum zu dem Gemisch und bemerkten, daß die Reaktion auch bei stark verdünntem Serum auftrat. Das Phänomen ist reversibel. Nach 3 x 24 Stunden sind die Thrombocyten wieder von den Borrelien gelöst.

Obwohl die Methode heute kaum noch gebräuchlich ist, wurde sie wegen ihrer hohen Spezifität vor allem zum Studium des Rückfallphänomens von mehreren Autoren (Brussin 39, Krantz 123, Kritschewski & Brussin 124, Brussin & Rogowa 38, Jakimow 107,108, Aristowsky & Schaechter, Gray 93) benutzt.

Nach den Untersuchungen von Brussin (39) Brussin & Schapiro (37), Sofieff (22), Rubinstein & Kapusto (263) Robertson (199) ist sie zur serologischen Trennung von Stämmen geeignet.

g) Agglutinine :

Eine häufig angewandte Methode ist der Nachweis von Agglutininen. Unter dem Einfluß eines Immunserums tritt eine "Verklumpung" von Bakterien auf, d.h., es tritt Agglutination ein.

In der Borrelien-Serologie ist die Objektträgeragglutination am gebräuchlichsten. (Novy & Knapp 180, Cunningham et al.56, 57, 58, 59, 60, Meleney 153,154, Sparrow 218, Heisch 96). Cunningham mischte infiziertes Blut und verschiedene Verdünnun-

gen von Immunserum zu gleichen Teilen in einer Pipette. Ein Tropfen des Gemisches wurde sofort auf einen Objektträger gebracht und im Dunkelfeld beobachtet. Stein (223) mischte gleiche Mengen verdünntes Immunserum und Antigen (Herstellung des Antigens s.u.) in einem Reagenzglas. Nach einer Reaktionszeit von 1/2 Std./ 37°C und 12 Std./4°C wurde das Ergebnis abgelesen.

Die Ergebnisse waren unterschiedlich. Novy & Knapp und Meleney konnten mit Immunserum gegen Borrelia (=B.) obermeieri Agglutination nachweisen. Aoki (9) gelang das Gleiche mit B. gallinarum. Stein wies Agglutinine im Immunserum gegen B. hermsi und B. obermeieri nach. Cunningham konnte mit seiner Methode bei B. carteri Ergebnisse erzielen, die zur Aufklärung des Rückfallphänomens (s.u.) von Bedeutung waren. Allerdings konnte er diese Ergebnisse mit B. duttoni nicht reproduzieren, ebensowenig Gray (92) und Heisch (96). Coleman (50, 51, 52) sah bei Versuchen mit B. novyi und B. duttoni lediglich Spontanagglutinationen.

Der Wert der Objektträgeragglutination ist sicher vornehmlich in der einfachen technischen Durchführung zu sehen. Das Auftreten von Spontanagglutination wie auch die Tatsache, daß Agglutinine offenbar nur gegen bestimmte B.-Stämme nachgewiesen werden können, schränkt den Wert dieser Methode ein. Robinson (200), Elsdon-Dew (71), El Ramli (70), Zarafonetis et al. (252), Garnham et al. (80) sowie Bodman (31) konnten eine unspezifische Agglutination beobachten. Bacterium proteus O X-K wurde vom Serum Rekurrenskranker agglutiniert. Die Methode wurde im größeren Maßstab an Patientenseren zur Beurteilung der Anwendungsmöglichkeit für die Diagnostik geprüft. Die Ergebnisse waren nicht eindeutig, was z.T. auf die Verwendung verschiedener O X-K-Stämme (Garnham et al. 80), z.T. auf Modifikation der Technik beruhen kann. Außerdem ist mit positiven Reaktionen in den nicht seltenen Fällen einer Kombination von Rückfallfieber mit Fleckfieber zu rechnen.

h) Immobilisine :

In neuerer Zeit wurde nach Einführung des Nelson-Testes (Nelson & Mayer (164) zum Nachweis spezifisch gegen Spirochaeta pallida gerichteter Immobilisine versucht, diese Methode auch auf Borrelien zu übertragen. (Nelson-Test : Syphilis Treponemen, aus höchstens 2 Tage alten Kaninchen-Orchitiden gewonnen, werden in einer Nährlösung unter sterilen Kautelen suspendiert und in einer Atmosphäre von 95 % Stickstoff und 5 % Kohlendioxyd und bei einer Temperatur von 35°C/18 Std. mit dem zu untersuchenden Serum und frischem Meerschweinchenserum als Komplement gemischt. Bei positivem Ausfall sind mehr als 50% der im Dunkelfeld ausgezählten Spirochaeten unbeweglich). Nach anfänglich günstiger Erfahrung mit dieser Technik (Levaditi et al. 130, 131, 132, Vaisman et al. 238, 239, 240) konnten Ranqueet al. (192, 193) damit keine Immobilisine gegen Borrelien nachweisen.

i) Komplementbindungsreaktion (KBR)

Im Jahre 1901 beschrieben Bordet & Gengou (32) als erste eine serologische Reaktion, bei der sensibilisierte rote Blutkörperchen als Indikator zum Nachweis von freiem Komplement im Reaktionssystem gebraucht wurden. Damit war es möglich, den Verbrauch von Komplement bei der Reaktion eines Antikörpers-System sichtbar zu machen, da das freie Komplement sensibilisierte Erythrocyten hämolysiert. Das Prinzip der sogen. Komplementbindungsreaktion (KBR) beruht auf diesen Beobachtungen. Im Reaktionsgemisch befinden sich zwei Antigen-Antikörper-Systeme. Das eine, das hämolytische System dient als Indikator für den Komplementverbrauch des anderen Systems, bestehend aus Antigen (Bakteriensuspension oder ähnliches) und dem auf spezifische Antikörper zu untersuchendem Serum.

Antigen +	Antikörper +	Komplement +	Antigen +	Antikörper
Bakterien-suspension o.ä.	Immunserum 1/2 Std./56°C zur Inaktiv. des Komple-ments.	frisches Meer-schweinchen-Serum	sensibili-sierte Schaf-Erythrocyten	Amboceptor-Anti-Schaf-erythrocyten-Kaninchen-serum (inaktiviert)

Positive Reaktion

spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion-Komplementverbrauch ..... . kein freies Komplement= keine Hämolyse

Negative Reaktion

keine spezifische Reaktion, da keine homologen Antikörper im Serum= kein Komplementverbrauch ..... freies Komplement= Hämolyse

Alle an der Reaktion beteiligten Reagentien müssen in genau definierter Konzentration vorliegen. Die Komplementdosis wird in einem Vorversuch bestimmt, wobei die Einwirkung abgestufter Komplementmengen auf das hämolytische System mit und ohne Antigen untersucht wird. Im allgemeinen wird die Komplementmenge, die eine vollständige Lysis herbeiführt, als eine Komplementeinheit definiert. Aus dem Vergleich des Ausfalls der Reaktion mit und ohne Antigen läßt sich ablesen, ob das zur Verwendung gelangende Antigen einen Komplement-Eigenverbrauch hat. Dieser Eigenverbrauch (antikomplementäre Wirkung des Antigens) muß bei der Bemessung der später im Hauptversuch zu verwendenden Komplementmenge berücksichtigt werden.

Bei der Untersuchung eines Serums auf seinen Gehalt an komplementbindenden Antikörpern wird einer der Reaktionspartner (Antigen, Serum oder Komplement) in einer Verdünnungsreihe abgestuft, die anderen konstant gehalten. Während bei den modernen Methoden, besonders in der Routine-Diagnostik,

die Serum-Abstufung bevorzugt wird, wird in älteren Arbeiten häufig das Antigen verdünnt. Besonders bei Mikromethoden ist die Komplementabstufung, bzw. die Messung des Komplementverbrauchs in konstantem System, üblich. Für speziell wissenschaftliche Fragestellung wird der Versuch "zweidimensional" ausgeführt, d.h., daß sowohl das Antigen, als auch das Serum in einem sogenannten Blocktest (s.u.) gegeneinander abgestuft werden.

Seit der Einführung der KBR in die serologische Methodik, insbesondere deren Anwendung in der Syphilis-Diagnostik (Wassermannsche Reaktion), wurden Versuche unternommen, mit dieser Technik auch komplementbindende Antikörper gegen Borrelien nachzuweisen.

Die größten Schwierigkeiten ergaben sich anfangs bei der Herstellung geeigneter Antigene. Da die Züchtung von Borrelien auf Nährböden mit großen Schwierigkeiten verbunden ist, mußte man versuchen, Borrelien als Träger der antigenen Substanz möglichst rein aus den Organen oder aus dem Blut infizierter Tiere zu gewinnen. Kolle & Schatiloff (120) und Manteufel (141) benutzten borrelienhaltiges Blut oder wässrige Extrakte aus zerriebenen Organen von infizierten Tieren. Zlatogoroff (254) und El Ramli (70) stellten alkoholische Organextrakte her.

Die Mehrzahl der älteren Autoren verwendete jedoch defibriniertes spirochaetenhaltiges Tierblut (Graetz (91), Aoki (9), Toyoda (233), Bjelokoff (28), Yano (250). Graetz erzielte seine Ergebnisse mit einer erhitzten Sprochaetensuspension als Antigen. In diesen Antigenen war naturgemäß der Anteil an unspezifischen Substanzen sehr hoch. Eine reine Darstellung von Borrelien gelang erst Stein (223) aus infiziertem Blut und Wolstenholme &Gear (249), sowie Yeo (251), aus infizierten bebrüteten Hühnereiern.

Stein entnahm Blut aus Mäusen und Ratten, die mit B.obermeieri bzw. B.hermsi infiziert waren und in denen sich die Borrelien gerade in der Vermehrungsphase befanden. Die Erythrocyten wurden durch Saponin hämolysiert. Das Gemisch wurde zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Sediment mehrmals mit Na Cl ausgewaschen. Das resuspendierte Sediment wurde bis zu einem bestimmten Trübungsgrad verdünnt. Im Dunkelfeld enthielt diese Verdünnung mehr als 80 Borrelien pro Feld. Dieses Antigen konnte im Eisschrank bis zu 4 Monaten aufbewahrt werden. Wolsten-

holme & Gear inokulierten infiziertes Mäuseblut in vorbebrütete Eier. Nach 7 Tagen weiterer Bebrütung wurden die Eier geerntet, indem die Chorioallantoismembran zerrissen wurde. Die mit Blut gemischte Allantoisflüssigkeit wurde zentrifugiert, um die Erythrocyten zu entfernen. Danach wurden die Borrelien in der Ultrazentrifuge sedimentiert und in Na Cl-Lösung resuspendiert. Diese Suspension wurde unverdünnt als Antigen gebraucht.

Von der schon oben erwähnten Möglichkeit, bei der Ausführung der KBR den einen oder anderen Reaktionspartner in seiner Konzentration zu variieren, hat man auch hier Gebrauch gemacht. Einige Autoren setzten fallende Antigenverdünnungen konstanten Serummengen entgegen (Kolle & Schatiloff 120, Graetz 91). Dagegen titrierten Manteufel (141), Toyoda (233), Aoki (9), Stein (223), Wolstenholme & Gear (249) fallende Serumverdünnungen gegen konstante Antigenmengen aus.

Wenn es auch, trotz der Vielzahl der angewandten Methoden, nicht gelungen ist, alle Fragen zu beantworten, so ist man doch zu wertvollen Teilergebnissen gekommen.

2) Zusammenfassung der in der Literatur berichteten Ergebnisse

Die experimentelle Bearbeitung des Rückfallfiebers mit immunologisch-serologischen Methoden wird dadurch erschwert, daß die antigene Struktur von Borrelien sehr komplexer Natur und - soweit mit den zur Verfügung stehenden Methoden zu erfassen - außerordentlich instabil ist. Nicht nur unter dem Einfluß eines Wirtswechsels (Toyota 234, Kudicke et al.121, Kroo 126, Brussin & Schapiro 37, Prigge et al.190, Sagel 207,209, Mathis & Durieux 147, Nicolle & Anderson 176, Baltazard 17,22, Rafyi et al.191), sondern auch innerhalb des Vermehrungszyklus treten eine Reihe von antigenen Varianten auf (Levaditi & Roché 129, Manteufel 140, Jancso 109, Kudicke et al.121, Brussin 39, Cunningham et al.56,57,58,59,60, Gori 90, Brussin & Rogowa 38, Meleney 153, Wainstein 243, Jakimow 107, Gray 93, Russel 204,205,206, Schuhardt 230, Lavaditi & Vaismann 130). Dies erschwert die Deutung experimen-

teller Befunde sehr. Bis heute sind wesentliche immunologische Fragen ungeklärt geblieben: Für eine Analyse der antigenen Struktur, z.B. in Form einer Faktorenanalyse oder der Aufdeckung von Partialantigenen wie bei Leptospiren (Schlossberger) fehlt eine geeignete serologische Methode. Unter diesem Gesichtspunkt sollen hier die oben erwähnten Methoden nur insoweit besprochen werden, als sie wesentlich zu der Kenntnis über die "Immunologie der Borrelien" beigetragen haben und durch mehrfache Nachprüfungen bestätigt worden sind. Da von allen Kriterien (vergleichende Morphologie, Stoffwechsel, fermentative Eigenschaften, Pathogenität usw.) bei Bakterien die antigene Struktur sich am stabilsten für die Typisierung erwies, wurde versucht, auch die Borrelien nach diesem Merkmal zu differenzieren. Die Notwendigkeit dazu drängte sich umsomehr auf, als bei der Xenodiagnose immer wieder neue Widersprüche auftauchten (s.o.).

Mit Hilfe des Kreuzimmunitätstests (Uhlenhuth & Haendel 242, Gleitsman 89, Nicolle & Anderson 171,172,173,174,177, Mathis 143,144, 145,146, Sagel 207, Pickoul 184, Kemp et al.115, Coleman 50, 51,52, Durieux et al.67, Kirk 118, Brumpt 33, Brumpt & Brumpt 34, Anderson et al.5, Heisch et al.98, Baltazard et al.23, Heisch 99, Addamiano 2), des Rieckenberg-Phänomens (Brussin 39, Brussin & Schapiro 37, Sofieff 222), der Agglutination (Novy & Knapp 180, Cunningham 56,58, Sparrow 218, Sofieff 222, Nicolle & Anderson 177, Stein 223), des Pfeiffer'schen Versuchs (Novy & Knapp 180, Uhlenhuth & Haendel 242, Kemp et al.115), der Lysis in vitro (Anderson et al.5, Nicolle & Anderson 177, Kemp et al.115) und der KBR (Stein 223, Manteufel 141) wurde eine serologische Differenzierung der Borrelien-Spezies versucht. Der Wert dieser Untersuchungen wird durch die labile antigenetische Struktur der Borrelien stark herabgesetzt. Hinzu kommt, daß das Rieckenberg'sche Phänomen und der Kreuzimmunitätstest zu spezifisch reagieren. Nicolle et al.(175), Baltazard (22), Dubois (64),65), Heisch (96), sowie Geigy &Burgdorfer (86), zeigten an den Beispielen von B.duttoni und B.hispanica, daß der Kreuzimmunitätstest Unterschiede "intra speciem" anzeigt.

Die Agglutination ist zu unempfindlich, zumal sie nur bei einigen Stämmen auftritt (Cunningham, Gray, Heisch, Coleman). Stein (223) und Manteufel (141) kamen auf Grund ihrer Untersuchungen zu dem Er-

gebnis, daß die komplementbindenden Antikörper nicht stammspezifisch sind. So konnte keine der angeführten Methoden zu einem befriedigenden Resultat führen und das Problem der Klassifizierung der Borrelien ist noch heute umstritten.

Der Wechsel der antigenen Struktur im Vermehrungszyklus, d.h., das Auftreten einer neuen antigenetischen Variante mit jedem Rückfall, legte schon mit den ersten Arbeiten auf diesem Gebiet (Levaditi & Roché 129, Manteufel 140) die Vermutung nahe, daß das Rückfallphänomen immunologische Ursachen habe.

Während die Mehrzahl der Autoren den Anstieg der Antikörper gegen die Ausgangsrasse für das Auftreten von modifizierten Rezidivrassen verantwortlich machte, behauptete u.a. Gray (92), daß gerade der Abfall der Antikörper ein Wiederauftreten der Borrelien ermögliche. Plaut & Grabow (187) glauben, daß die Antikörper überhaupt keinen Einfluß auf die Vermehrung der Borrelien haben. Dieser Ansicht sind auch Aristowsky &Höltzer (10), Lapidari & Sparrow (127) und Wolman & Wolman (248), die ein periodisches Ansteigen und Abfallen der Borrelien-Population auf Kulturen beobachteten. Darüber hinaus konnten Wolman &Wolman im Kreuzimmunitätstest einen Wechsel der antigenen Struktur von Borrelien in Kulturen nachweisen.

Die antigenetische Verschiedenheit von Ausgangs- und Rezidivrasse wurde von Manteufel (140) Jancso (109) Kudicke et al.(121) mit der Methode des Kreuzimmunitätstestes (s.a. Gori (90), Adler & Ashel 3, Kirk 118) und des Pfeiffer'schen Versuches, von Brussin (39), Brussin &Rogowa (38), Aristowsky & Schaechter (11), Aristowsky &Wainstein (12) mit dem Rieckenberg'schen Phänomen, sowie von Wainstein (243) und Russel (204), 205, 206) durch den Nachweis rassenspezifischer Lysine gezeigt. Jakimow (107) wies mit der Rieckenberg'schen Reaktion nach, daß 50 % der Rezidivrassen (1.Rezidiv) des gleichen Stammes serologisch distinkt waren, was für eine große Kapazität der Borrelien, neue Varianten zu bilden, spricht.

Cunningham (57) fand bei Anwendung der Kreuzagglutination acht, Meleney (153) fünf distinkte Rezidivrassen. Nach den Untersuchungen von Cunningham ist der antigenetische Unterschied zwischen Aus-

gangs- und 1.Rezidivrasse am größten, während die nachfolgenden Rezidivrassen langsam wieder die antigenetische Struktur der Ausgangsrasse annehmen. Wainstein (243) machte die gleiche Beobachtung. Kudicke et al.(121), Brussin (39), Brussin & Rogowa (38), Aristowsky & Wainstein (12), Jakimow (107) und Russel (206) wiesen mit den verschiedenartigsten Methoden nach, daß die Rezidivrassen bei Subpassagen die Tendenz zur Rückverwandlung in die Ausgangsrasse zeigen.

Der Einwand, daß die antigenetischen Varianten in der inoculierten Erregerpopulation schon vorhanden sind, bzw. daß das Auftreten der Varianten auf die antigene Inhomogenität einer solchen Population zu beziehen ist, konnte durch die Versuche von Schuhardt (230), Geigy & Sarassin (85) widerlegt werden. Diese Autoren züchteten aus Einzelborrelien sogenannte Isolatstämme und konnten auch bei Infektion mit diesen Stämmen antigenetisch distinkte Rezidivrassen nachweisen.

Zur Beurteilung der Immunitätsverhältnisse während des Infektionsverlaufs sind der Nachweis von Antikörpern mit den obengenannten serologischen Methoden und die Beziehung dieser Antikörper zur Immunität untersucht worden. Nach allgemeiner Ansicht treten Antikörper erst relativ spät und nur kurze Zeit im Serum auf. Thrombocytobarine (Brussin 39) und Lysine (Levaditi & Roché 128, Wainstein 243, Russel 204, 205, Schuhardt 230, Balteanu 24, Bjelokoff 28, Sergent 212) traten 2 - 4 Tage nach der Krisis auf. Die Lysine erreichten ihr Maximum in der Reconvalescentenphase und waren nach etwa 5 - 6 Monaten wieder verschwunden. Aristowsky & Schaechter (11) verglichen die Arbeiten von Jakimow (107) und Wainstein (243) mit ihren Ergebnissen und fanden einen "Titerparallelismus" der Thrombocytobarine und der Lysine.

Die Agglutinine treten ebenfalls erst im ersten Intervall auf, steigen nach den Rezidiven an und fallen 2 Wochen später stufenweise wieder ab (Cunningham 56, Stein 223). Der Titerverlauf bei der unspezifischen Proteus OXK-Agglutination ist ähnlich (Elsdon - Dew 71, Zarafonetis 252).

Kolle & Schatiloff (120), Graetz (91) und El Ramli (70) konnten im 2.Intervall komplementbindende Antikörper nachweisen.

Zlatogoroff (254), Stein (223), Wolstenholme &Gear (249) erhielten dagegen mit der KBR schon bei Seren aus dem 1.Intervall positive Resultate. Ein Rezidiv wirkt als neuer antigener Reiz und führt bei Anwendung unempfindlicherer Methoden, wie z.B. der Agglutination und der Komplementbindungsreaktion, zu einem Nachweis ansteigender Titer. Auch die komplementbindenden Antikörper konnten nur kurze Zeit (2 Monate) nach der Infektion nachgewiesen werden.

Der Schutzversuch zeigt als einzige Methode über lange Jahre hinaus das Vorhandensein von Schutzstoffen an. Diese sind jedoch so hochspezifisch, daß sie nur bei Reinfektion mit dem gleichen Stamm festgestellt werden können (s.oben). Das konnte durch eine Reihe von epidemiologischen Beobachtungen bestätigt werden (Geigy & Mooser 83, Geigy, Mooser & Weyer 84). Reinfektionen in endemischen Gebieten sind möglich und sogar häufig, da ein Stamm sich schon durch einen Wirtswechsel antigenetisch verändert.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich schon für die praktische Diagnostik einige Schlüsse ableiten. Die Anwendung der Methoden zum Nachweis von Thrombocytobarinen und Lysinen, sowie des Schutzversuches, mußten auf Grund ihrer hohen Spezifität ohne nennenswerten Erfolg bleiben. Ballif et al.(16) berichten allerdings von Ergebnissen mit dem routinemäßigen Nachweis von Lysinen. Der Test fiel noch 406 Tage post infectionem positiv aus. Mit der Objektträgeragglutination von 179 Ummunseren gegen B.carteri konnte Cunningham (57,58) gute diagnostische Resultate erzielen.Jedoch konnte er diese Ergebnisse mit B.duttoni nicht reproduzieren.

Die Agglutination von Proteus OXK wurde von Robinson (200) Elsdon-Dew (71), Bodman (31), Garnham et al. (80), Zarafonitis (252) und El Ramli (70) als diagnostisches Hilfsmittel benutzt. Die Titer erwiesen sich oft als nur sehr niedrig und der positive Ausfall bei Fleckfieber bereitete differential-diagnostische Schwierigkeiten.

Zlatogoroff (254), El Ramli (70), Stein (223), und Wolstenholme &Gear (249) unternahmen Versuche, die KBR für die Diagnostik nutzbar zu machen. Mit Organextrakten als Antigen hatten Zlatogoroff und El Ramli bei einem hohen Prozentsatz der von ihnen

untersuchten Fälle positive Resultate. Stein u. Wolstenholme & Gear konten gereinigte Antigene herstellen (s.oben) und in Einzelfällen von Rückfallfiebererkrankungen die Diagnose mit Hilfe der KBR stellen. Durch Kontrollen stellten sie fest, daß Seren von Fleckfieber, Typhus, Pest, Weil, Syphilis, Bang, Malaria, Pneumonie u.a. keine positive Komplementbindung mit ihrem Rekurrens-Antigen gaben.

Die WaR zeigte in 1/3 - 2/3 der geprüften Fälle zeitweise (während des Anfalls und bis 2 Wochen danach) einen positiven Ausfall (Roaf 198, Russel 204, Bjelokoff 28, Chang 44, Chung 48, Tsun T'ung 237).

Insgesamt gesehen ist eine vergleichende Diskussion wegen der Vielfalt der methodischen Voraussetzungen außerordentlich schwierig bzw. kaum möglich. Immerhin gestattet die Anwendung moderner Methoden in der KBR zur Definition der Qualität eines Antigens gewisse quantitative Rückschlüsse auf den Gehalt komplementbindender Antikörper eines untersuchten Serums. Zumindest kann durch eine Standardisierung der Methode die Grundlage für vergleichende Untersuchungen geschaffen werden, auch wenn sich die Komplementbindung zur Sicherung der Rekurrens-Diagnose in der Praxis nicht ausreichend bewährt hat.

III. Eigene Untersuchungen.

In den folgenden Untersuchungen soll die Methode der KBR auf ihre Anwendungsmöglichkeit zur serologischen Diagnostik menschlicher Rückfallfiebererkrankungen überprüft werden. Dabei wurden außerdem Ergebnisse erwartet, die es gestatten, bei einer kritischen Diskussion der Methodik zur Frage der Bildung komplementbindender Antikörper und der Qualität von Antigenen Stellung zu nehmen.

Methodik

a) Stamm :

Von Prof. Weyer (Tropeninstitut Hamburg) wurde mir freundlicherweise ein Recurrensstamm zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um die ägyptische Varietät von Borrelia crocidurae (Davis & Hoog-

straal 62) aus der sogenannten "Crocidura-Gruppe". Der natürliche Zeckenwirt ist O. erraticus (kleine Rasse). Der Stamm ist pathogen für den Menschen, Ratten, weiße Mäuse, Affen, junge Kaninchen, apathogen für das Meerschweinchen. Weyer & Mooser (245) gelang es, diesen Stamm auf Läuse zu übertragen, und ihn in Laus- zu Laus-Passagen über Monate kontinuierlich zu halten, wobei sich die intracoelomale Inokulation als Methode der Wahl erwies. Die pathogenetischen Eigenschaften des Stammes gingen für Menschen und Mäuse dabei nicht verloren.

b) Antigenherstellung :

Während früherer Untersuchungen (Eidmann 69) war der Stamm auf weißen Mäusen gehalten worden. Durch einige Vorpassagen wurde er auf weiße Ratten adaptiert. Mit besonderen Schwierigkeiten war bei der Adaptation nicht zu rechnen, da die Stämme der Crocidura-Gruppe natürlicherweise für eine Reihe von Nagetieren pathogen sind (Boiron 30). Die Inokulation fand jeweils subkutan statt. Der Infektionsverlauf wurde im Dunkelfeld kontrolliert. So wurde sichergestellt, daß die Überimpfung stattfand, während sich die Borrelien in der Phase ihrer exponentiellen Vermehrung (= log-phase) befanden, und daß keine Rezidivrasse überimpft wurde. Bei der von uns gewählten Stärke des Inoculums (Dunkelfeldkontrolle : 20-50 Borrelien pro Feld) wurde gewöhnlich von dem 2. - 4. Tag post infectionem die 1. Spirochaetämie beobachtet. Am 5. Tage folgte gewöhnlich die Krisis.

20 Ratten à 100 g wurden unter gleichen Bedingungen infiziert. Kurz vor dem Höhepunkt der 1. Spirochaetämie wurden sie nach Betäubung mit Narkoseaether durch Halsschnitt entblutet. Das Blut wurde zur Gerinnungshemmung im Verhältnis 1 : 1 in 0,85%iger Na Cl-Lösung, die mit 0,5 ‰ Liquoid versetzt war, aufgefangen. (Die Liquoidlösung wurde bei 4°C aufbewahrt. Sie darf nicht älter als 2 Monate sein, da später langsam ein Verlust der gerinnungshemmenden Wirkung eintritt.) Die Erythrocyten wurden bei 2000 UpM/ 3-4 Minuten/20°C (Stock-Zentrifuge

8 x 350) abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und das Sediment in physiologischer Na Cl solange ausgewaschen, bis der Überstand bei Kontrolle im Dunkelfeld nur noch wenige Borrelien pro Feld enthielt. In der Ultrazentrifuge wurden die Borrelien aus dieser Suspension bei 15000 UpM/20 Min./4°C abzentrifugiert. Das weißliche Sediment wurde einmal mit Aqua dest. ausgewaschen und darauf in 10-30 ml Veronalpuffer (Mayer et al.15l) resuspendiert. Das so gewonnene Antigen wurde homogenisiert. Da nach 30 Minuten bei Zimmertemperatur eine Entmischung des homogenen Antigens beobachtet werden konnte, wurde dieses sofort nach Fertigstellung und nach jeweiligem Gebrauch in einer Kältemischung eingefroren und bei - 10°C gelagert.

c) Herstellung eines Hyperimmunserums :

Ein gesundes Kaninchen wurde zweimal wöchentlich, insgesamt 6 mal, mit einer Borrelien-Suspension i.v. immunisiert. Nach einer Pause von 1 Monat wurde dieser Immunisierungscyklus wiederholt. Die Suspension wurde zu jedem Immunisierungsdatum frisch aus 4 infizierten Mäusen, die sich kurz vor dem Höhepunkt der Spirochaetämie befanden, in der oben geschilderten Weise hergestellt. Das Borrelien-Sediment wurde in 3,0 ml physiologischer Na Cl-Lösung resuspendiert und diese Suspension dem Kaninchen sofort in die Ohrvene injiziert. Die Dunkelfeldkontrollen zeigten, daß ein Teil der Borrelien zum Zeitpunkt der Injektion noch beweglich war.

Nach der letzten Immunisierung wurde das Kaninchen in Narkose mit einem Halsschnitt entblutet. Das Blut wurde bei 500 UpM/3-4 Minuten zentrifugiert, so daß sich die Erythrozyten absetzten. Das überstehende Serum wurde vorsichtig abgehoben und als Standard-Serum in Ampullen abgefüllt, lyophilisiert und bei +4°C gelagert. Für den jeweiligen Gebrauch wurde eine kleine Menge lyophilisiertes Serum auf das Ausgangsvolumen mit Aqua bidest. aufgefüllt und gelöst.

d) Technik der Komplementbindungsreaktion :

1. Vorversuch : In einem Vorversuch wurde die optimale Komplementmenge für jede im Hauptversuch benutzte Antigenkonzentration bestimmt. Dabei wurde das Komplement abgestuft einer Antigenverdünnungsreihe in Abwesenheit von Serum entgegengesetzt. Um ein konstantes Reaktionsvolumen zu erhalten, wurde als Serumersatz Veronalpuffer (Mayer et al. 151) zugesetzt. Als Komplement diente frisches, nicht erhitztes Meerschweinchenserum, das aus gesunden Tieren gewonnen wurde. Das Serum wird nach 12-18 Stunden/4°C auf seinen Gehalt an Komplement untersucht.

Abweichend von der in der Routine gebräuchlichen Technik wurde die Komplementverdünnungsreihe folgendermaßen hergestellt :

Menge des Meerschweinchenserums 1:30 verd. in ml	3,0	2,8	2,6	2,4	2,2	2,0
Veronalpuffer in ml	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
Endkonzentration	1:40	1:42	1:45	1:50	1:54	1:60

	1,8	1,6	1,4	1,2	1,0	...
	2,2	2,4	2,6	2,8	3,0	...
	1:66	1:75	1:86	1:99	1:100	usw.

Diese Art der Verdünnungsreihe ergibt eine feinere Abstufung, wodurch eine exaktere Dosierung der Komplementmenge möglich ist.

Eine Antigenverdünnungsreihe mit dem Faktor 2 wurde aufgestellt. Wenn z.B. 6 ml jeder Antigenverdünnung gebraucht wurden, wurde die Verdünnungsreihe folgendermaßen aufgestellt :

6 ml Antigen unverd.
+6 ml Puffer

12 ml Antigen 1 : 1, davon 6 ml Antigen 1 : 1
+ 6 ml Puffer

12 ml Antigen 1 : 2, davon 6 ml Antigen 1 : 2
+ 6 ml Puffer

12 ml Antigen 1 : 4

usw.

Um genauere Abstufungen zu erhalten, wurde dabei mit Pipettenwechsel gearbeitet. Nachdem eine Verdünnung durch mehrmaliges Ansaugen gemischt worden war, wurden 6 ml davon in die vorgelegte Puffermenge des nächsten Röhrchens überpipettiert. Der Inhalt dieses Röhrchens wurde mit einer neuen Pipette gemischt usw.

Zur Herstellung des hämolytischen Systems wurden Hammel-Erythrocyten mit Veronalpuffer solange gewaschen, bis der Überstand klar war. Darauf wurde eine 2 %ige Suspension dieser Erythrocyten in Puffer hergestellt. Hämolytischer Amboceptor (Behringwerke Titer 1:4000) wurde in einer Verdünnung von 1:1200 in Puffer angesetzt und der Erythrocytensuspension in gleicher Volumenmenge hinzugefügt. Nach 30 Minuten/37°C zur Sensibilisierung der Erythrocyten war das System gebrauchsfertig und wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufgehoben.

Bei der Ausführung sämtlicher Versuche wurde jedes Reagens in 0,25 ml (sogen. Vierteldosen) einpipettiert.

Schema des Vorversuchs :

Antigen 1:2			0	1	3	3	3	
1:1		0	(1)	1	3	3	3	
0					0	3	3	
	1:60	1:66	1:75	1:86	1:99	1:120	1:150	1:200	1:300	1:600
Komplement										

Nachdem Puffer als Serumersatz vorpipettiert worden war, wurden die Komplementverdünnungen und die Antigenverdünnungen in die Röhrchen eingefüllt. Zur Kontrolle des Eigenverbrauches an Komplement durch das Antigen wurde in der 1.Reihe das Antigen durch Puffer ersetzt.

Die Reaktionszeit für die Komplementbindung betrug beim Vorversuch 1 Std./37°C, beim Hauptversuch 17 Std./4°C. Danach wurde das hämolytische System einpipettiert und nach 1 Std./37°C, Reaktionszeit für die Lysis der Versuch abgelesen. Der Grad der Hämolyse wurde in 4 Stufen eingeteilt :

0 = komplette Lysis
(1) 1, 2 = verschiedene Grade einer unvollständigen Lysis
3 = keine Lysis, d.h. Überstand über den leicht sedimentierten Erythrocyten zeigt keine rötliche Verfärbung.

Als eine Komplementeinheit wurde die Menge an Komplement definiert, die für eine völlige Hämolyse eben ausreicht. Im Hauptversuch wurden jeweils 2 Komplementeinheiten verwandt. Wenn z.B. das Röhrchen mit einer Komplementverdünnung von 1:120 eben

noch vollständig gelöst war, wurde im Hauptversuch eine Komplementverdünnung von 1 : 60 in 0, 25 ml = 2 Komplementeinheiten gebraucht.

e) Die Antigenauswertung :

Das Antigen wurde im Blocktest ausgewertet. Antigenverdünnungen wurden gegen Serumverdünnungen eines bekannten Immunserums und eines Normalserums (Kaninchen-Normalserum-Pool) austitriert. Als Beispiel soll die Auswertung einer Antigencharge angeführt werden :

Antigenverdünnungen	1:100	1:200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	Komplementkonzentration
1:64	0	0	0							1:75
1:32	2	2	1	0						1:75
1:16	3	3	2	2	0					1:75
1:8	3	3	3	2	0					1:60
1:4	3	3	3	2	1	0				1:60
1:2	3	3	3	3	1	0	0			1:60
1:1	3	3	3	3	3	2	1	0		1:50
Serum-kontrolle 0	0									1:100

Kaninchen-Immunserum

Antigenverdünnungen								Komplementkonzentration
1:64	1	0	0					1:75
1:32	2	2	2	0	0			1:75
1:16	3	3	3	2	1	0		1:75
1:8	3	3	3	2	2	0		1:60
1:4	3	3	3	3	2	1	0	1:60
1:2	3	3	3	3	3	3	2	1:60
1:1	3	3	3	3	3	3	3	1:50
Serumkontrolle 0	0							1:100
	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	

Kaninchen-Immunserum

Um eine größere Anzahl von verschiedenen Serumverdünnungsstufen zu erhalten, wurden zwei verschiedene Serumverdünnungsreihen mit dem Faktor 2 hergestellt (Technik s. Herstellung der Antigenverdünnungsreihe). Nachdem Antigen und Serum einpipettiert worden waren, wurde das Komplement in der für die jeweilige Antigenverdünnung optimalen Konzentration (s. oben) zugesetzt. Nach den oben erwähnten Reaktionszeiten wurde der Versuch abgelesen.

Um eine evtl. Eigenhemmung des zu untersuchenden Serums festzustellen, wurde in eine Röhrchenreihe kein Antigen einpipettiert, sondern dieses durch Puffer ersetzt (=Serumkontrolle). In dem hier aufgezeichneten Versuch konnte keine Eigenhemmung des Serums gefunden werden.

In einer Antigenkontrolle wurde den verschiedenen Antigenverdünnungen in Abwesenheit von Serum Komplementabstufungen von 2, 1 1/2, 1 u, 1/2 Einheit entgegengesetzt.

Antigenverdünnungen					
	1:64	0	0	1	3
	1:32	0	0	1	3
	1:16	0	0	2	3
	1:8	0	0	1	3
	1:4	0	0	2	3
	1:2	0	0	2	3
	1:1	0	0	2	3
		2	1 1/2	1	1/2

Komplementeinheiten

Bei guter Komplementeinstellung zeigten die Röhrchen mit 2 und 1 1/2 Komplementeinheiten völlige Lysis, 1 Einheit teilweise Lysis und 1/2 Einheit keine Lysis.

Durch die Auswertung des Normalserums sollte geprüft werden, ob in dem Serum gesunder Tiere Antigenkörper vorhanden sind, die durch Reaktion mit unserem Borrelien-Antigen eine Ablenkung des Komplements verursachten.

Antigen							Komplementkonzentration
	1:8	0				1:60	
	1:4	2	2	0		1:60	
	1:2	3	3	2	0	1:60	
	1:1	3	3	3	3	1	1:50
Serumkontrolle	0	0					1:100
		1:8	16	32	64	128	

Kaninchen-Normalserum

Die Tabelle zeigt, daß das Normalserum nur in den niedrigen Serumverdünnungen zu einer Hemmung der Hämolyse führt.

Die Reaktion des Antigens mit dem Immunserum kann also unter Berücksichtigung dieser Kontrollen als spezifisch betrachtet werden.

Die Ergebnisse eines derartigen Blocktestes gestatten die Definition einer Antigen-Einheit. Eine Antigen-Einheit ist die Menge, die bei vorhandenem Antikörperüberschuß eben noch eine vollständige Komplementbindung zeigt. Bei unserem Beispiel (s. Tabellen) sind 0, 25 ml der Antigenverdünnung 1 : 16 eine Antigen-Einheit. Als Serum-Endtiter wurde die vollständige Komplementbindung (letztes Röhrchen mit 3) abgelesen.

Mit Bezug auf die benutzte Antigenmenge kann ebenso der Gehalt des zur Verwendung gelangenden Immunserums an komplementbindenden Antikörpern definiert werden. Aus der oben abgebildeten Tabelle ergibt sich, daß bei Verwendung von 4 Antigen-Einheiten (=0, 25 ml der Antigenverdünnung 1:4) in 0, 25 ml einer Serumverdünnung von 1 : 400 eine Antikörper-Einheit enthalten ist, bei unverdünntem Antigen (= 16 Einheiten) in 0, 25 ml einer Serumverdünnung von 1:1600 eine Antikörper-Einheit enthalten ist. Allerdings zeigten unsere Auswertungen, daß bei keiner Antigencharge ein Punkt erreicht werden konnte, bei dem durch weitere Konzentration des Antigens konstante bzw. abfallende Serum-Titer erreicht werden.

Dieses läßt insofern einen Rückschluß auf die Qualität unseres Antigens zu, als bei hochwertigen Antigenen im allgemeinen dieser Punkt erreicht wird. Unsere Antigenauswertungen sollten jedoch lediglich die Definition einer bestimmten Antigenmenge ermöglichen, um unsere Serum-Titer vergleichbar zu machen.

In allen weiteren Untersuchungen von Mäuse-Seren, Menschen-Seren und Kaninchen-Seren (s. unten) wurden 4 Antigen-Einheiten verwandt, d.h. die zu untersuchenden Seren wurden mit nur eindimensionaler Technik ausgewertet.

Als positive Serumkontrolle wurde das Kaninchen-Hyperimmunserum als Standardserum gegen 4 Antigen-Einheiten = Ag-E), das Antigen gegen 4 Antikörper-Einheiten (= Ak-E) austitriert.

Antigen				Standardserum			
1 : 32	0	=	1/2 Ag-E	1:800	0	=	1/2 Ag-E
1 : 16	3	=	1 Ag-E	1:400	3	=	1 Ag-E
1 : 8	3	=	2 Ag-E	1:200	3	=	2 Ag-E
1 : 4	3	=	4 Ag-E	1:100	3	=	4 Ag-E
	1 : 100	=	4 Ak-E		1 : 4	=	4 Ag-E
	Kaninchen-Standardserum						

Dadurch war es möglich, sowohl den Titer des Standard-Serums, als auch den Gebrauchstiter des Antigens zu kontrollieren.

Ergebnisse :

a) Ergebnisse der Antigenauswertungen im Blocktest.

Bei der Auswertung verschiedener aus infiziertem Rattenblut hergestellter Antigenchargen in der oben beschriebenen Form fanden sich unspezifische Reaktionen mit Kaninchen-Normalserum. Ein Antigen, das in der Verdünnung 1 ; 20 noch eine unspezifische Reaktion mit Normalserum zeigte und in größerer Menge vorlag, wurde zu weiteren Untersuchungen verwandt.

Um eine evtl. vorhandene Lipoidkomponente zu entfernen, wurde ein Quantum dieser Antigencharge mit Aether behandelt. Zu diesem Zwecke wurde die Borrelien-Suspension mit Narkoseaether gründlich gemischt. Nach kurzer Zeit setzte sich das Antigen ab und der Aetherüberstand wurde abgegossen. Außerdem wurde bis zur Geruchlosigkeit Stickstoff durch die Suspension geleitet, um den verbliebenen Aether aus der wässrigen Phase zu beseitigen.

Dieses so vorbehandelte Antigen wurde erneut im Blocktest ausgewertet. Es zeigte keine unspezifischen Reaktionen, auch nicht in den niedrigen Verdünnungsstufen, mit Kaninchen-Normalserum.

Die Reaktion mit dem Hyperimmunserum zeigte die gleichen Titer, wie bei der Auswertung vor der Aetherbehandlung. Das unverdünnte, aetherbehandelte Antigen enthielt in 0,25 ml 40 Antigen-Einheiten. In einer weiteren Versuchsanordnung sollte die Hitzestabilität des Antigens geprüft werden. Darum wurde ein Teil des Antigens 1 Std./90°C erhitzt und danach im Blocktest ausgewertet. Die Ergebnisse der Auswertungen des mit Aether behandelten Rattenantigens vor und nach Hitzeeinwirkung sind in Tab.1 zusammengestellt.

Tabelle 1

	Antigenverdünnung			
	1 : 10	1 : 20	1: 40	1 : 80
1. Antigen vor Hitzebehandlung	300	300	75	0
2. Antigen nach Hitzebehandlung	300	75	75	0

Tabelle 1 : Ergebnisse der Auswertung eines mit Aether behandelten Borrelien-Antigens aus dem Blut infizierter Ratten vor und nach Hitzebehandlung gegen ein Kaninchen-Immunserum in der KBR (Blocktest). Angegeben sind die reziproken Titer der höchsten Serumverdünnung mit vollständiger Komplementbindung. Aus den Ergebnissen geht hervor, daß das Antigen hitzestabil ist.

Für die folgenden Untersuchungen von Mäuse-Seren, menschlichen Seren und den Seren eines immunisierten Kaninchens wurde dieses aetherbehandelte Antigen verwandt. Die Gebrauchsverdünnung von 1 : 10 enthielt dabei in 0,25 ml 4 Antigen-Einheiten. Das Antigen wurde durch Austitrierung gegen 4 Antikörper-Einheiten bei jeder KBR kontrolliert.

b) Ergebnisse der Untersuchung von Mäuse-Seren.

Im Rahmen von quantitativen Untersuchungen, die am Tropen-Institut (tropenhygienische Abteilung) über den Infektionsverlauf an weißen Mäusen gemacht wurden (Eidmann 69), war Gelegenheit gegeben, Mäuse-Seren aus quantitativ definierten Stadien der experimentellen Infektion zu untersuchen.

Im einzelnen wurden die Seren zu folgenden Zeitpunkten gewonnen :

Tage post infectionem	Serum		
6	1a	8 960	Borrelien/mm^3
	1b	10 240	" "
	1c	17 920	" "
9	2a	1 342 440	" "
	2b	2 160 640	" "
	2c	1 648 640	" "
10	3a	Dunkelfeldkontrolle =	
	3b	sichere Krisis, Tiere	
	3c	klinisch schwerkrank	
11	4a	Dunkelfeldkontrolle =	
	4b	Intervall	
	4c		
14	5a	Dunkelfeldkontrolle =	
	5b	kein Rückfall	
	5c		
19	6a - c	keine weiteren Kontrollen Serumpool	
26	7a - c	Serumpool	
33	8a - c	Serumpool	
40	9a - c	Serumpool	
47	10a - c	Serumpool	

Es wurden je 3 Tiere in der "log-phase", der "stationary-phase", der "declining-phase" und zu verschiedenen Zeitpunkten bis 6 Wochen nach der Infektion entblutet und die

Seren in Ampullen eingeschmolzen bei -70^{0}C gelagert. Unter "log-phase" wäre die Zeit der exponentiellen Zunahme der Erregerzahl im peripheren Blut, unter "stationary-phase" der Zeitabschnitt, da Vermehrung und Untergang von Borrelien im Gleichgewicht stehen, und unter "declining-phase" der sich klinisch unter dem Bilde der Krisis manifestierende schnelle Abfall der Anzahl der Erreger im Blut zu verstehen.

Die Seren wurden mit der Komplementbindungsreaktion bei Gebrauch von 4 Antigen-Einheiten untersucht. Da einerseits nur sehr wenig Serum aus den einzelnen Mäusen zur Verfügung stand, andererseits aber die Versuche reproduziert werden sollten, wurde die Serumverdünnungsreihe erst bei 1 : 10 begonnen.

Es zeigte sich, daß die Bildung komplementbindender Antikörper nur im geringen Ausmaß stattgefunden hatte. Die Seren 4a, b, c, entnommen 1 Tag nach der Krisis, zeigten Serum-Titer von 1 : 10, die Seren aus der 1. und 2. Woche nach der Spirochaetaemie (5a, b, c, 6a - c, 7a - c, s. oben) gaben eine positive Reaktion bis zu einem Titer von 1 : 20. Alle anderen Seren waren negativ, d.h. der Serum-Titer war niedriger als unsere Serumanfangsverdünnung von 1 : 10.

Eine Eigenhemmung des Serums (Serumkontrolle) wurde bei einer Verdünnung von 1 : 10 nicht mehr gefunden.

c) Ergebnisse der Untersuchung von menschlichen Seren.

Durch den Kontakt einer frischen Schnittwunde mit infiziertem Mäuseblut kam es zu einer Laborinfektion, die Gelegenheit zur Untersuchung menschlicher Seren gab. Am 10. Tag nach der Infektion trat hohes Fieber ein, das 4 Tage andauerte. Die Diagnose konnte durch den Erregernachweis mit Hilfe des dicken Tropfen-Präparates während der Continua gesichert werden. Kurz nach Beginn der Entfieberung wurde die Krankheit mit hohen Gaben von Chloramphenicol behandelt. Ein Rückfall trat nicht auf.

Vom Tage der Krisis an wurde in mehrtägigen Abständen 3 Wochen lang Blut aus der Kubitalvene entnommen und das Serum untersucht. Es konnten keine komplementbindenden Antikörper nachgewiesen werden. Alle untersuchten Serumproben waren bis zu einer Verdünnung von 1 : 4 negativ.

d) Verlauf der Bildung der komplementbindenden Antikörper nach künstlicher Immunisierung eines Kaninchens.

Ein Kaninchen wurde mit einem Antigen i.v. immunisiert. Zur Herstellung dieses Antigens wurden 18 Mäuse subkutan infiziert und der Verlauf der Infektion täglich im Dunkelfeld kontrolliert. Auf der Höhe der Spirochaetämie wurden die Mäuse entblutet. Durch Zentrifugieren (s. Herstellung des Antigens) wurden die Borrelien als gereinigtes, weißliches Sediment gewonnen. Das Sediment wurde in 20 ml Na Cl-Lösung unter Zusatz von 0,5% Phenol resuspendiert und bei -10^{0}C gelagert. Die Immunisierung des Kaninchens erfolgte zweimal wöchentlich 3 Wochen lang mit 2,0 ml des Antigens, das intravenös (in die Ohrvene) injiziert wurde. Nach einer Pause von 2 Wochen wurde das Tier durch 4 Injektionen von 2,0 ml Antigen in halbwöchigen Abständen nachimmunisiert. Vor jeder Injektion, während der Pause und bis 3 Wochen nach dem zweiten Immunisierungszyklus wurden jeweils 2,0 - 3,0 ml Blut entnommen. Das daraus gewonnene Serum wurde in Ampullen abgefüllt und bei -10^{0}C gelagert.

Die gesammelten Seren wurden mit der Komplementbindungsreaktion untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 1 dargestellt.

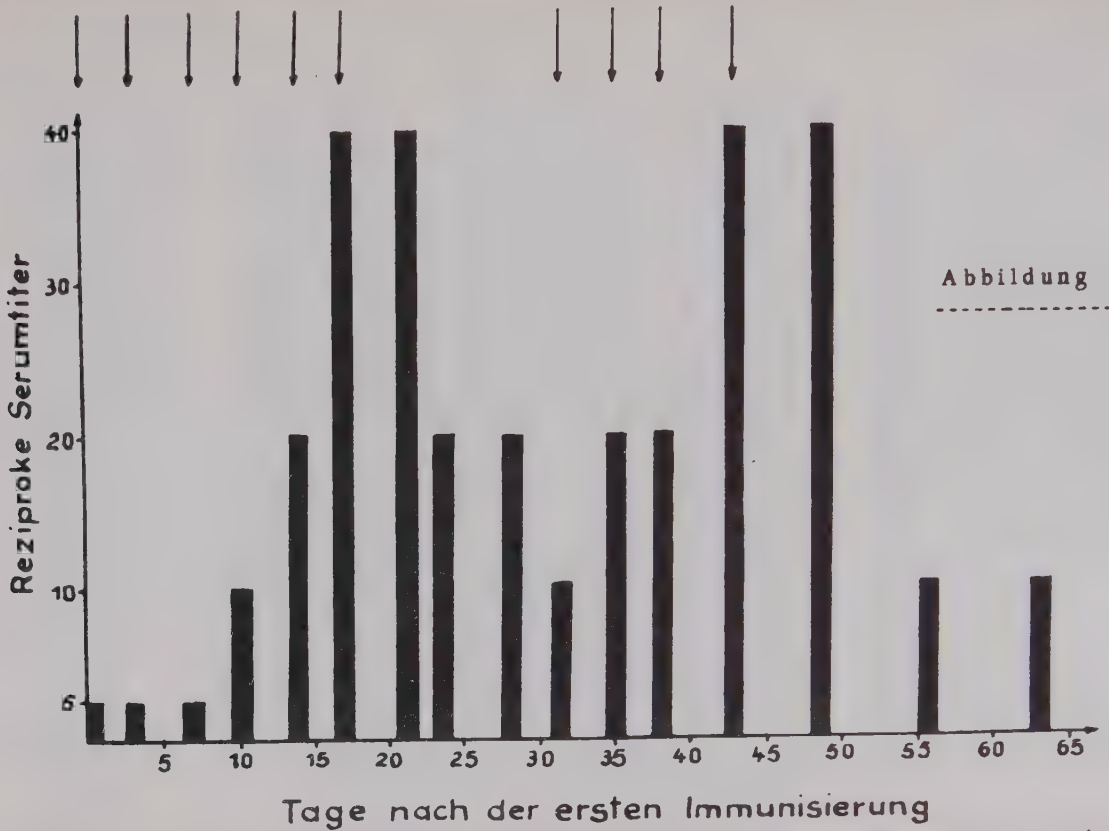

Abbildung 1

Abb. 1 : Bildung komplementbindender Antikörper im Verlauf der Immunisierung eines Kaninchens. Angegeben sind die reziproken Titer der höchsten Serumverdünnung mit vollständiger Komplementbindung. Die Pfeile bedeuten jeweils eine Immunisierung mit 2,0 ml einer gereinigten Borrelien-Suspension.

Es zeigte sich, daß auch hier komplementbindende Antikörper nur im geringen Ausmaß gebildet worden waren. Mit 1 : 40 erreichte der Titer nach 4 Wochen seinen Höhepunkt, fiel aber während der Immunisierungspause schnell wieder ab. Im Verlauf des zweiten Immunisierungszyklus stieg er wieder an, erhob sich aber nicht über das Niveau der im 1. Zyklus erreichten Titer. Nach Beendigung der Immunisierung fiel er innerhalb von 2 Wochen bis zu einem Resttiter von 1 : 10 wieder ab.

Ganz im Gegenteil dazu hatten wir bei der Immunisierung unseres ersten Kaninchens ein Serum mit hohem Titer erhalten (s. Tab. 1). Der Grund für diese Diskrepanz mag hauptsächlich in der unterschiedlichen Qualität der zur Immunisierung benutzten Antigene liegen.

Das erste Kaninchen wurde mit einer jeweils zum Immunisierungsdatum aus 4 infizierten Mäusen frisch hergestellten Borrelien-Suspension immunisiert. Wie die Dunkelfeldkontrolle zeigte, waren in diesem Falle zum Zeitpunkt der Injektion die Borrelien noch beweglich.

Zur Immunisierung des hier untersuchten Kaninchens diente eine Borrelien-Suspension, aus infiziertem Mäuseblut hergestellt, die vor Beginn der Immunisierung bereits längere Zeit bei -10°C gelagert worden war. Die Borrelien in dieser Suspension waren also abgetötet. Offenbar ist aber der Reiz zur Bildung komplementbindender Antikörper bei einer frisch hergestellten Erreger-Suspension mit noch lebenden Borrelien höher.

IV. Diskussion

Die mannigfaltigen Versuche, eine serologische Methode zur Sicherung der Diagnose des Rückfallfiebers in der Praxis zu finden, haben zu keinem restlos befriedigenden Ergebnis geführt. Die experimentelle Untersuchung der Borrelien gestaltet sich durch die große Variationsbreite und die auffällige Neigung zu Mutationen besonders schwierig. So erwies sich der häufig angewandte Schutzversuch als zu spezifisch, da sich mit ihm Immunität nur gegen den homologen Stamm nachweisen ließ. Diese hohe Spezifität des Schutzversuches gebrauchte man dann in der Abwandlung zum Kreuzimmunitätstest zur Differenzierung heterologer Borrelien-Stämme. Dieser Test verlor jedoch an Bedeutung, als man feststellte, daß die verschiedensten Umwelteinflüsse (wie Passagen über Tier oder Mensch, Vektorenwechsel usw.) den Stamm derart verändern konnten, daß er im Versuchstier zur Reinfektion führte, und sich damit also wie ein heterologer Stamm verhielt.

Auch andere serodiagnostische Methoden, wie der Nachweis von Thrombocytobarinen, Lysinen und Immobilisinen, führten nicht zum gewünschten Erfolg, da sie teils zu spezifisch, teils ihre Ergebnisse widersprechend waren. In der von Cunningham (56) bei Borrelia carteri angewandten Objektträgeragglutination bot sich eine technisch einfach auszuführende Methode an. Sie ließ sich aber nicht allgemein einführen, da bei anderen Borrelien-Stämmen eine Agglutination nicht auftrat.

Nicht zuletzt versuchten einige Autoren die Komplementbindungsreaktion in der Borrelien-Serologie anzuwenden. Auch in der vorliegenden Arbeit sollte das Auftreten komplementbindender Antikörper untersucht und die Anwendungsmöglichkeit der Komplementbindungsreaktion zur Diagnostik des Rückfallfiebers geprüft werden.

Ein Vergleich der in der Literatur mitgeteilten Ergebnisse auf der einen Seite und unserer Resultate auf der anderen Seite ist auf Grund der sehr verschiedenartigen methodischen Voraussetzungen kaum möglich. Schon allein bei der Herstellung der Antigene wurden sehr unterschiedliche Wege eingeschlagen. Die Notwendigkeit dazu ergab sich aus der Tatsache, daß Borrelien sich nur schwer auf Kulturen züchten lassen. So wurden teils wässrige (Kolle & Schatiloff 120, Manteufel 141), teils al-

koholische (Zlatogoroff 254, El Ramli 70) Organextrakte oder auch defibriniertes, borrelienhaltiges Blut (Graetz 91, Aoki 9, Bjelokoff 28) als Antigene benutzt. Diese Antigene enthielten in hohem Maße verunreinigende Substanzen und wiesen eine beträchtliche Eigenhemmung auf. Erste Versuche, ein Antigen zu reinigen, unternahmen Toyoda (233) und Yano (250), indem sie aus borrelienhaltigem Blut die Erythrocyten absedimentierten. Stein (223) dagegen haemolysierte infiziertes Blut durch Saponine und zentrifugierte sodann die Borrelien ab, was aber wahrscheinlich macht, daß das Sediment Erythrocytenhüllen enthielt. Aus diesem Grunde wurde von uns das Auftreten einer Haemolyse vermieden. Unsere Methode der Herstellung eines gereinigten Antigens aus infiziertem Tierblut durch "fraktioniertes Zentrifugieren" gleicht weitgehend der von Wolstenholme & Gear (249), wenn auch diese die Allantoisflüssigkeit infizierter, bebrüteter Hühnereier als Ausgangsmaterial wählten. Bei der Ernte der Allantoisflüssigkeit wird aber auch diese durch Blut aus den Gefäßen der Chorioallantoismembran verunreinigt. Die Verwendung von infiziertem Tierblut hat den Vorteil, daß sie bei einem kleineren Aufwand von Material und Zeit eine größere Menge Antigen ergibt.

Die Auswertung eines Borrelienantigens auf seine antigene Qualität ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Stein gibt zwar den Trübungsgrad des resuspendierten Borrelien-Sediments an, was aber keiner qualitativen Aussage über das Antigen gleichkommt. Die Auswertung im Blocktest hingegen, wie sie von uns vorgenommen wurde, gestattet es, eine antigene Einheit zu definieren. Um Konzentrationsunterschiede der Borrelien in der Suspension zu vermeiden, war das Antigen zuvor homogenisiert worden. So war es uns möglich, bei der Ausführung der Komplementbindungsreaktionen eine Antigenverdünnung zu benutzen, welche in 0,25 ml = 4 Ag-E (Antigeneinheiten) enthielt. Erst diese Standardisierung der Methode erlaubt es, die Serumtiter, also den Gehalt der verschiedenen Seren an komplementbindenden Antikörpern, zu vergleichen.

Ehe die Ergebnisse besprochen werden können, muß die Frage nach der Spezifität der Methode erörtert werden. Die Normalserumkontrolle hatte zunächst eine unspezifische Hemmung der Haemolyse bis zu Titern von 1 : 10 und 1 : 20 gezeigt. Nach der Behandlung des Antigens mit Aether, in der Absicht, die Lipoidkomponente zu entfernen, konnte auch bei niedrigen Normalserumverdünnungen (1 : 2) keine unspezifische Reaktion des Antigens mehr

beobachtet werden. Gleichzeitig wurde aber die spezifische Reaktion nicht vermindert. Dies ist umso bemerkenswerter, da am Beispiel der Wassermann'schen Reaktion gezeigt werden konnte, daß Rekurrensserum mit einem Lipoid-Antigen eine Komplementablenkung verursacht (Roaf 198, Russel 204, Raynaud & Pegullo 194, Kaul 114, Bjelokoff 28, Pai 182, Chang 44, Chung 48, Tsun T'ung 237).

Graetz (91) hatte bei seinen 1916 mit der KBR angestellten Untersuchungen über das Rückfallfieber ein erhitztes Antigen gebraucht. Auch die Ergebnisse von Aoki (9) und Kempetal (116), die Immunität durch Inoculation einer gekochten, bzw. auf 52°C erhitzten Spirochaetenaufschwemmung erzeugten, wiesen darauf hin, daß der Träger der antigenen Komponente hitzestabil ist. Tatsächlich konnten wir mit Hilfe des Blocktestes feststellen, daß ein Erhitzen des Antigens auf 90°C/1 Std. die antigene Wirkung nicht vermindert.

War mit den oben angeführten Untersuchungen die spezifische Wirkung des Antigens diskutiert, so mußte ferner der Gehalt der untersuchten Seren an unspezifisch reagierenden Faktoren kontrolliert werden. Die Serumkontrollen (= ohne Antigen) zeigten mitunter eine Ablenkung des Komplements. Aus diesem Grunde wurde auch in der Kontrolle das Serum abgestuft. Es erwies sich, daß bei Verdünnungen von 1 : 4, 1 : 8 die unspezifischen Faktoren meistens schon ausverdünnt waren, und das Röhrchen kompletten Lysis der sensibilisierten Schaf-Erythrocyten zeigte. Ergab die Antigen-Antikörper-Reaktion höhere Titer als die Serumkontrolle, so konnte das Ergebnis als spezifisch abgelesen werden. Titer von gleicher Höhe konnten in einem solchen Falle dagegen nicht als beweisend angesehen werden.

Bei unseren Untersuchungen konnten wir durchweg die Bildung komplementbindender Antikörper, wenn auch nur im geringen Ausmaße, nachweisen. Wiewohl die Titer niedrig waren (1 : 10, 1 : 20, 1 : 40), wurde ihre Spezifität doch durch die Kontrollen erhärtet. Da die in der älteren Literatur angegebenen Komplementbindungsreaktionen nur ein unvollständiges oder überhaupt kein Kontrollsystem enthalten, ist es schlecht möglich, ihre Ergebnisse zu interpretieren. Neuere Untersuchungen (Stein 223, Wolstenholme & Gear 249), in der Methodik den unseren ähnlich, haben höhere Serumtiter (1 : 400, 1 : 500) ergeben. Das mag z.T. auf der Ver-

wendung anderer Borrelien-Stämme beruhen, da die antigene Stärke der Borrelien verschieden ist, was auch aus der Tatsache hervorgeht, daß die Immunitätsdauer post infectionem bei den einzelnen Stämmen verschieden lang ist. Zum Teil dürften die Unterschiede der Ergebnisse auch auf rein formelle Gründe zurückzuführen sein. Die Art und Weise der Ablesung der Serum-Endtiter kann bereits die Differenz von 2 Titerstufen ausmachen. Stein liest als Ergebnis die eben beginnende Hemmung der Lysis (= Röhrchen mit 1) ab, während von uns nur die komplette Hemmung der Lysis (=-Röhrchen mit 3) angegeben worden ist. Auch sind verschiedene Reaktionszeiten bei der KBR angewandt worden. Während Stein, Wolstenholme & Gear als Reaktionszeit 30 Min./37°C bzw. 60 Min./37°C angeben, wurde von uns die Kältebindung bei 18 Std./4°C benutzt.

Nun könnte man, bei der Anwendung der KBR in der praktischen Diagnostik niedrige Titer als die Folge einer natürlichen Durchseuchung ansehen, was bei anderen Infektionskrankheiten diskutiert wird. Dies ist bei Rückfallfieber aber nicht anzunehmen, da die Ergebnisse von Zlatogoroff u. Stein sowie unsere Untersuchungen an Mäusen und Kaninchen zeigten, daß die komplementbindenden Antikörper sehr bald wieder aus den Seren verschwinden. Das Auftreten relativ niedriger Titer, wie auch wir sie nach Infektion von weißen Mäusen und nach künstlicher Immunisierung eines Kaninchens fanden, beruht vielmehr darauf, daß der antigene Reiz von Borrelien auf die Bildung komplementbindender Antikörper, im Gegensatz zu anderen bakteriellen und Virus-Infektionen, sehr gering ist. Übereinstimmend wird in der Literatur das Auftreten höherer Titer erst nach einem Rückfall beobachtet. Das hängt offenbar damit zusammen, daß ein Rezidiv sich als neuer antigener Reiz auswirkt. Daraus erklärt sich auch das negative Resultat der Untersuchung des menschlichen Serums. Der Patient war am Tage nach der Krisis mit einer hohen Dosis Chloramphenicol behandelt worden, so daß kein Rückfall auftrat.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß komplementbindende Antikörper unseren Untersuchungen zufolge nur in geringem Ausmaße und erst relativ spät nachgewiesen werden können. Sie erreichen ihre höchste Konzentration bald und sind nach kurzer Zeit wieder aus den Seren verschwunden. Aus diesem Grunde scheint uns eine Anwendung der Komplementbindungsreaktion in der praktischen Diagnostik des Rückfallfiebers als nicht gegeben. Jedoch kann die KBR in der Einzelaufklärung von Rekurrenzerkrankungen, so-

wie bei der Klärung wissenschaftlicher Fragestellungen zu Resultaten führen. Dabei ist es wichtig, durch eine Standardisierung der Methode die Voraussetzung für vergleichbare Ergebnisse zu schaffen.

V. Zusammenfassung

1. Es wird eine Übersicht über die serologischen und immunologischen Untersuchungen und Ergebnisse der Literatur gegeben.

2. Ein gereinigtes Antigen wird hergestellt, im Blocktest gegen ein Kaninchen-Hyperimmunserum ausgewertet und eine Antigen-Einheit definiert. Eine unspezifische Reaktion des Antigens wird durch Aetherbehandlung (= Entfernung der Lipoidkomponente) vermieden. Die vergleichende Auswertung eines auf 90°C/1 Std. erhitzten Antigens zeigt, daß der Träger der antigenen Substanz hitzestabil ist.

3. Seren von Mäusen aus verschiedenen Stadien der Infektion, menschliche Seren, sowie die Seren eines immunisierten Kaninchens, werden bei Verwendung von 4 Antigen-Einheiten untersucht.

4. Komplementbindende Antikörper konnten nur in geringem Ausmaß und für kurze Zeit nachgewiesen werden. Eine Anwendung der KBR in der Borrelien-Serologie erscheint unter bestimmten Voraussetzungen erfolgversprechend.

Literaturverzeichnis

1. Ackermann, V., Prosatov, N. : Arch. Schiffs.-Tropenhyg. 40, 352, (1936)

2. Addamiano, L., Babudieri, B. : Bull. World Health Organiz. 17, 483, (1957)

3. Adler, S., Ashbel, R. : Ann. Trop. Med., Liverpool, 31, 89, (1937)

4. Anderson, E.S. : Transact. Roy. Soc. Trop. Med. 40, 93, (1946)

5. Anderson, Ch., Berge, Ch., Fauconnier, H., Runacher, A. : Arch. Inst. Pasteur, Tunis, 30, 118, (1941)

6. Anderson, T.F. : East Afr. Med. J. 24, 259, (1947)

7. Anderson, T.F., Zimmermann, L.E. : Ammer, J. Path. 31, 1083 (1955)

8. Annecke, S. : S. Afr. Med. J. 26, 720, (1952)

9. Aoki, K. : Zschr. Immunitforsch. 23, 127, (1915)

10. Aristowsky, W., Höltzer, R. : Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 91, 175, (1924)

11. Aristowsky, W.M., Schaechter, E.P. : Zschr. Immunitforsch. 57, 347 (1928)

12.	Aristowsky, W.M., Wainstein, A.B. :	Zschr. Immunitforsch. 61, 296, (1929)
13.	Aristowsky, W.M. et al. :	Zschr. Immunitforsch. 63, 240, (1929)
14.	Ashbel, R. :	Ann. Trop. Med., Liverpool, 36, 97, (1942)
15.	Atkey, O.P.H. :	Bull. Off. internat. hig publ., Paris, 21, 1932, (1929)
16.	Ballif, L., Constantinesco, N., Chelaresco, M. :	Bull. Acad. med. Roumaine 19, 527, (1946)
17.	Baltazard, M., Mofidi, C., Bahmanyar, M., Seydian, B. :	Compt. rend. Acad. Sci. 225, 82, (1947)
18.	Baltazard, M. :	Arch. Inst. d'Hessarek 4, 57, (1946)
19.	Baltazard, M. :	Bull. Soc. path. exot., Paris, 40, 77, (1947)
20.	Baltazard, M. ' Bahmanyar, M., Chamsa, M. :	Bull. Soc. path. exot., Paris, 47, 864, (1954)
21.	Baltazard, M. et al. :	Bull. Soc. path. exot., Paris, 43, 595, (1950)
22.	Baltazard, M. :	Bull. Soc. path. exot., Paris, 29, 667, (1936)

23. Baltazard, M. et al. : Bull. Acad. med., Paris, 133, 284, (1949)

24. Balteanu, I., Russ, M., Voiculescu, M. : Arch. Roumain. pathol. 15, 310, (1948)

25. Balteanu, I. et al. : Arch. roumain. pathol. 15, 312, (1948)

26. Bardach, J. : Ann. Inst. Pasteur, Paris, 13, 365, (1899)

27. Beck, M.D. : J. Infect. Dis., Chicago, 60, 64, (1937)

28. Bjelokoff, P., Schuhalter, W. : Arch. Schiffs.-Tropenhyg. 26, 265, (1922)

29. Blanc, G., Chabaud, A.G., Bruneau, J.: Ann. parasit., Paris, 26, 361, (1951)

30. Boiron, H. : Bull. Med. A.O.F. 5, 173, (1948)

31. Bodman, R.I., Stewart, J.S. : Brit. Med. J., Febr. 14, 291, (1948)

32. Bordet, J., Gengou, O. : Ann. Inst. Pasteur, Paris, 15, 290, (1901)

33. Brumpt, E. : Compt. rend. Acad. Sci. 208, 2029, (1939)

34. Brumpt, E., Brumpt, L.C. : Ann. Parasit-Humaine 17, 287, (1939)

35. Brussin, A.M., Sternberg, E.J. : Giorn. batt. Immun. 21, 46, (1938)

36. Brussin, A.M., Sternberg, E.J. : Giorn. batt. Immun. 21, 207, (1938)

37. Brussin, A.M., Schapiro, S.L. : Arch. Schiffs. Tropenhyg. 32, 12, (1928)

38. Brussin, A.M., Rogowa, G.J. : Zbl. Bakt. Orig. 105, 39, (1927)

39. Brussin, A.M. : Zschr. Immunitforsch. 44, 328, (1925)

40. Bruynoghe, R., De Greef, E., Dubois, A. : Compt. rend. Soc. Biol. 96, 1073, (1927)

41. Bruynoghe, R., Dubois, A. : Compt. rend. soc. Biol. 98, 1247, (1928)

42. Bruynoghe, R. : J. State. Med., London, 36, 3, (1928)

43. Cantacuzène, J. : Ann. Inst. Pasteur, Paris, 13, 529, (1899)

44. Chang, S. : Chin. Med. J. 54, 163, (1938)

45. Charmot, G., Le Henand, F., Gindicelli, P. : Bull. Soc. path. exot., Paris, 46, 295, (1953)

46.	Chen, Y.P., Zia, S.H., Anderson, H.H. :	Amer. J. Trop. Med. 25, 115, (1945)
47.	Chorine, V. :	Compt. rend. Soc. Biol. 112, 1164, (1933)
48.	Chung, H.L. :	Transact. Roy, Soc. Trop. Med., London, 31, 625, (1938)
49.	Coghill, N.F., Gambles, R.M. :	Ann. Trop. Med., Liverpool, 42, 113, (1948)
50.	Coleman, G.E. :	J. Infect. Dis., Chicago, 54, 1, (1934)
51.	Coleman, G.E. :	J. Infect. Dis., Chicago, 54, 281, (1934)
52.	Coleman, G.E. :	J. Infect. Dis., Chicago, 54, 295, (1934)
53.	Creighton :	zit. n. Martini (1955)
54.	Cook, A.R. :	J. Trop. Med., London, 32, 339, (1904)
55.	Cuboni, E. :	Bol. Sez. ital. Soc. internaz. microbiol. 1. 274, (1929)
56.	Cunningham, J. :	Transact. Roy. Soc. Trop. Med., London, 19, 11, (1925)
57.	Cunningham, J., Theodore, H.J., Fraser, A.G.L. :	Indian J. Med. Res. 22, 105, (1934)

58. Cunningham, J., Fraser, A.G.L. : Indian J. Med. Res. 22, 595, (1935)

59. Cunningham, J., Fraser, A.G.L. : Indian J. Med. Res. 24, 571, (1937)

60. Cunningham, J., Fraser, A.G.L. : Indian J. Med. Res. 24, 581, (1937)

61. Davis, G.E. : Publ. Amer. Assoc. Adv. Sci. 18, 41, (1942)

62. Davis, G.E., Hoogstraal, H. : J. Egypt. Publ. Health Ass. 29, 139, (1949)

63. Davis, G.E. : Exper. Parasitol. 5, 271, (1956)

64. Dubois, A. : Ann. Soc. belge méd. trop. 29, 15, (1949)

65. Dubois, A. : Ann. Soc. belge méd. trop. 29, 455, (1949)

67. Durieux, C., Arquié, E., Carrière, Ch. : Bull. Soc. path. exot., Paris, 30, 555, (1937)

68. Dutton, J.E., Todd, J.L. : Lancet, London, 2, 1953, (1907)

69. Eidmann, E., Lippelt, H. : Zschr. Tropenmed., Stuttgart, Dez. (1959)

70. El Ramli, A.H. : J. Egypt. Publ. Health Ass. 21, 1, (1946)

71. Elsdon-Dew, R. : Nature, London, 13, 565, (1943)

72. Falcone, G. : Arch. ital. sc. med. trop. e parasitol. 31, 1031, (1951)

73. Gabritschewsky, G. : Ann. Inst. Pasteur, Paris, 10, 629, (1896)

74. Gabritschewsky, G. : Ann. Inst. Pasteur, Paris, 11, 238, (1897)

75. Gabritschewsky, G. : Zbl. Bakt. Abt. I Orig. 23, 365, (1898)

76. Gabritschewsky, G. : Zbl. Bakt. Abt. I Orig. 23, 439, (1898)

77. Gabritschewsky, G. : Zbl. Bakt. Abt. I Orig. 23, 635, (1898)

78. Gabritschewsky, G. : Zbl. Bakt. Abt. I Orig. 23, 721, (1898)

79. Gabritschewsky, G. : Zbl. Bakt. Abt. I Orig. 23, 778, (1898)

80. Garnham, P.C.C., Davies, C.W., Heisch, R.B., Timms, G.L. : Transact. Roy. Soc. Trop. Med. 41, 141, (1947)

81. Gaud, M., Morgan, M.T. : Bull. World Health Organizat. 1, 69, (1947 - 48)

82. Gefel, A., Rubenow, R. : Harefuah, Jerusalem, 44, 263 (1953) engl. Zus.fass.

83. Geigy, R., Mooser, H. : Acta trop., Basel, 12, 327, (1955)

84. Geigy, R., Mooser, H., Weyer, F. : Acta trop., Basel, 13, 193, (1956)

85. Geigy, R., Sarasin, G. : Acta trop., Basel, 15, 254, (1958)

86. Geigy, R., Burgdorfer, W. : Acta trop., Basel, 8, 151, (1951)

87. Gel'ttser, R.R., Krylova, O.P. : J. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 28, 1281, (1957)

88. Gimeno De Sande : Rev. San. hyg. publ., Madrid, 28, 342, (1954)

89. Gleitsman : Zbl. Bakt. Abt. I Orig. 68, 31, (1913)

90. Gori, P. : zit. n. Trop. Dis. Bull. 25, 588, (1928)

91. Graetz, F. : Zbl. Bakt. Abt. I Orig. 78, 18, (1916)

92. Gray, J.D.A. : Ann. Trop. Med., Liverpool, 22, 273, (1928)

93. Gray, J.D.A. : Ann. Trop. Mes., Liverpool, 23, 241, (1929)

94.	Greaves, F.C., Gezon, H.M., Alston, W.F. :	Bull. U.S.Navy Dep. Div. Prev. Med. 45, 1029, (1945)
95.	Grenier, M. :	Bull, Soc. path. exot., Paris, 7, 565, (1914)
96.	Heisch, R.B. :	East. Afric. Med. J. 27, 1, (1950)
97.	Heisch, R.B., Furlong, M. :	East. Afric. Med. J. 31, 561, (1954)
98.	Heisch, R.B., Garnham, P.C.C. :	Parasitology 38, 247, (1948)
99.	Heisch, R.B. :	Ann. Trop. Med., Liverpool, 44, 260, (1950)
100.	Heronimus, E.S. :	Zbl. Bakt. Abt. I Orig. 105, 394, (1928)
101.	Hirschboek, M.M. :	Amer. J. Trop. Med. 3, 712, (1954)
102.	Hoffmann, W.H. :	zit. n. Trop. Dis. Bull. 20, 130, (1923)
103.	Hoffmann, W.H. :	zit. n. Trop. Dis. Bull. 22, 713, (1925)
104.	Ingraham, H.S., Lapenta, R.G. :	Bull. U.S. Navy Dep. Div. Prev. Med. 46, 1719 (1946)
105.	Jahnel, F. :	Zbl. Bakt. Abt. I Orig. 130, 349 (1933)
106.	Jakimow, W. Ph. :	Zschr. Immunitforsch. 59, 288, (1929)

107.	Jakimow, W.Ph. :	Zschr. Immunitforsch. 64, 9, (1929)
108.	Jakimow, W.Ph. :	Zschr. Immunitforsch. 58, 413, (1928)
109.	Jancso, N. :	Zbl. Bakt. 81, 457 (1918)
110.	Jepson, W.F. :	Nature, London, 160, 874, (1947)
111.	Juarez, E., Fernandez, E. :	Rev. San. Hyg. Publ., Madrid, 28, 133, (1954)
112.	Kalajew, A.W. :	Giorn. batt. immun. 7, 184, (1931)
113.	Kalra, S.L., Jacob, V.P. :	Indian J. Med. Res. 39, 311, (1951)
114.	Kaul, S. :	Indian Med. Gaz. 84, 433, (1949)
115.	Kemp, H.A., Moursund, R.H., Wright, H.E. :	Amer. J. Trop. Med. 13, 425, (1933)
116.	Kemp, H.A. et al. :	Amer. J. Trop. Med. 14, 159, (1934)
117.	Kemp, H.A. et al. :	Amer. J. Trop. Med. 14, 163, (1934)
118.	Kirk, R. :	Ann. Trop. Med., Liverpool, 32, 339, (1938)
119.	Koch, R. :	Dtsch. med. Wschr. 31, 1865, (1905)

120. Kolle, W., Schatiloff, P. : Dtsch. med. Wschr. 34, 1176, (1908)

121. Kudicke, R., Feldt, A., Collier, W.A. : Zschr. Hyg. 102, 135, (1924)

122. Kusonoki, F. : Zschr. Chemotherap., Leipzig, I Abt. Orig. 1, 11, (1913)

123. Krantz, W. : Zschr. Immunitforsch. 48, 207, (1926)

124. Kritschewski, J.L., Brussin, A.M. : Zschr. Immunitforsch. 49, 180, (1926)

125. Kritschewski, J.L., Rubinstein, P.L. : Zschr. Immunitforsch. 71, 372, (1931)

126. Kroó, H. : Klin. Wschr. 4, 1355 (1925)

127. Lapidari, M., Sparrow, H. : Arch. Inst. Pasteur, Tunis, 17, 191, (1928)

128. Levaditi, C., Roché, J. : Compt. rend. Soc. biol., Paris, 62, 619, (1907)

129. Levaditi, C., Roché, J. : Compt. rend. Soc. biol., Paris, 62, 815, (1907)

130. Levaditi, C., Vaisman, A., Hamelin, A. : Ann. Inst. Pasteur, Paris, 83, 437, (1952)

131. Levaditi, C. et al. : Ann. Inst. Pasteur, Paris, 83, 256, (1952)

132. Levaditi, C. et al. : Ann. Inst. Pasteur, Paris, 83, 260, (1952)

133. Levaditi, C. et al. : Ann. Inst. Pasteur, Paris, 80, 9, (1951)

134. Lippelt, H. : Das Rückfallfieber im Handbuch der inneren Medizin, Springer, Berlin, 1. Teil 12, 402, (1952)

135. Lippelt, H. : Klinik der Gegenwart 5, 229, (1957)

136. Livingstone : Missionary Travels and Researches in South Africa, London, 1, 628, (1857)

137. Lourie, E.M., Collier, H.O.J. : Ann. Trop. Med., Liverpool, 37, 200, (1943)

138. Lovett, W.C.D. : Transact. Roy. Soc. Trop. Med., London, 50, 157, (1956)

139. Mackie, F.P. : Brit. Med. J. 2, 1706, (1907)

140. Manteufel, P. : Arb. Gsd. amt., Berlin, 27, 327, (1907 - 1908)

141. Manteufel, P. : Arb. Gsd. amt. Berlin, 28, 172, (1908)

142. Mathis, C. : Bull. Soc. path. exot., Paris, 20, 826, (1927)

143. Mathis, C. : Bull. Soc. path. exot., Paris, 20, 1038, (1927)

144. Mathis, C. : Compt. rend. Acad. Sci. 186, 46, (1928)

145. Mathis, C. : Bull. Soc. path. exot., Paris, 21, 472, (1928)

146. Mathis, C. : Bull. Soc. path. exot., Paris, 21, 585, (1928)

147. Mathis, C., Durieux, C. : Compt. rend. Acad. Sci. 194, 1107, (1932)

148. Marchoux, E., Chorine, V., Koechlin, D. : Compt. rend. Soc. Biol. 119, 1280, (1935)

149. Martini, E. : Welt-Seuchen-Atlas II, 51 (1956)

150. Martini, E. : Erg. Hyg. 29, 213, (1955)

151. Mayer, M.M., Osler, A.G., Heidelberger, M. : J. Exper. Med. 84, 535, (1946)

152. Mazotti, L. : Rev. Inst. salubr. enferm. trop., Mexiko, 11, 53, (1950)

153. Meleney, H.E. : J. Exper. Med. 48, 68, (1928)

154. Meleney, H.E. : J. Exper. Med. 48, 805, (1928)

155. Metchnikoff, E. : Virchows Arch. path. Anat. 109, 176, (1887)

156. Metchnikoff, E. : Ann. Inst. Pasteur, Paris, 10, 654, (1896)

157. Metchnikoff, E. : Ann. Inst. Pasteur, Paris, 11, 245, (1897)

158. Mooser, H., Weyer, F. : Zschr. Tropenmed., Stuttgart, 5, 28, (1954)

159. Mooser, H. : Zschr. Tropenmed., Stuttgart, 9, 93, (1958)

160. Mooser, H. : Erg. d. Mikrobiol. Imm. u. Exp. Therapie 31, 184 (1958)

161. Nabarro, D., Greig, E.D.W. : Sleeping Sickness Comission, Roy. Soc. 5, 9 (1905)

162. Narain, S., Kalra, S.L. : Indian Med. Gaz. 85, 87, (1950)

163. Nauck, E.G. : Die Infektionskrankheiten des Menschen und ihre Erreger II, 1191 (1958)

164. Nelson, R.A., Mayer, M.M. : J. Exper. Med. 89, 369, (1949)

165. Nicolle, Ch., Blaizot, L., Conseil, E. : Compt. rend. Acad. Sci. 154, 1636, (1912)

166. Nicolle, Ch. et al. : Compt. rend. Acad. Sci. 155, 481 (1912)

167. Nicolle, Ch. et al. : Arch. Inst. Pasteur, Tunis 4, 201, (1912)

168. Nicolle, Ch. et al. : Ann. Inst. Pasteur, Paris, 27, 204, (1913)

169. Nicolle, Ch. et al. : Arch. inst. Pasteur, Tunis, 1 (1913)

170. Nicolle, Ch. et al. : Bull. Soc. path. exot., Paris, 6 107, (1913)

171. Nicolle, Ch., Anderson, Ch., Rahal, M. : Arch. Inst. Pasteur, Tunis, 16, 123, (1927)

172. Nicolle, Ch., Anderson, Ch., Colas-Belcour : Arch. Inst. Pasteur, Tunis, 16, 219, (1927)

173. Nicolle, Ch., Anderson, Ch. : Compt. rend. Acad. Sci. 186, 991, (1928)

174. Nicolle, Ch., Anderson, Ch. : Compt. rend. Acad. Sci. 187, 746 (1928)

175. Nicolle, Ch., Anderson, Ch., Hornus, P. : Compt. rend. Acad. Sci. 188, 1211 (1929)

176. Nicolle, Ch., Anderson, Ch., Laigret, J. : Compt. rend. Acad. Sci. 193, 1370, (1931)

177. Nicolle, Ch., Anderson, Ch. : Compt. rend. Acad. Sci. 194, 1618, (1932)

178. Nohira, A. : Japan Med. World. 9, 83, (1929)

179. Nohira, A. : Japan Med. World. 9, 119, (1929)

180. Novy, F.G., Knapp, R.E. : J. infect. Dis., Chicago, 3 291, (1906)

181. Obermeier, O. : Berliner klin. Wschr. (1873)

182. Pai, S.E. : Chin. Med. J. 52, 595, (1937)

183. Pfister, R. : Bull. Soc. path. exot., Paris, 42, 547, (1949)

184. Pickoul, I.N. : zit. n. Trop. Dis. Bull, 26, 651, (1929)

185. Plaut, F. : Dtsch. med. Wschr. 54, 424, (1928)

186. Plaut, F. : Wien. klin. Wschr. 41, 1005 (1928)

187. Plaut, F. Grabow, C. : Zschr. Immunitforsch. 68, 494, (1930)

188. Prigge, R. : Zschr. Hyg. 106, 552 (1926)

189. Prigge, R. : Dtsch. med. Wschr. 52, 356, (1926)

190. Prigge, R., Rothermundt, M. : Zschr. Hyg. 108, 398, (1928)

191. Rafyi, A., Maghami, Gr.R. : Bull. Soc. path. exot. 42, 215, (1949)

192. Ranque, J., Depieds, R., Nicoli, R.M. : Bull. Soc. path. exot. 48, 326, (1955)

193. Ranque, J., Depieds, R., Faure, A. : Bull. Soc. path. exot. 50, 360, (1957)

194. Raynaud, R., Pégullo, J. : Algérie méd. 3, 241, (1946)

195. Reimers, H.J. : Dissertation, Hamburg (1953)

196. Reiter, H. : Dtsch. med. Wschr. 51, 1400, (1925)

197. Remlinger, P., Bailly, J. : Compt. rend. Soc. Biol. 104, 460, (1930)

198. Roaf, H.E. : Brit. J. Exper. Path. 3, 59, (1922)

199. Robertson, R.C. : Chin. Med. J. 46, 853, (1932)

200. Robinson, P. : Brit. Med. J. Aug. 22, 216, (1942)

201. Rosenholz, H.P., Scherbina, L.I. : Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 134, 42, (1935)

202. Ross, P.H., Milne, A.D. : Brit. Med. J. 2, 1453, (1904)

203. Rubinstein, P.L., Kapusto, M.L. : Zschr. Immunitforsch. 72, 309, (1931)

204. Russel, H. : W. Afr. Med. J. 4, 59, (1931)

205. Russel, H. : W. Afr. Med. J. 6, 36, (1933)

206. Russel, H. : Transact. Roy. Soc. Trop. Med., London, 30, 179, (1936)

207. Sagel, W. : Beih. Arch. Schiffs. Tropenhyg. 32, 283, (1928)

208. Sagel, W. : Arch. Schiffs. Tropenhyg. 32, 178, (1928)

209. Sagel, W. : Arch. Schiffs. Tropenhyg. 34, 429, (1930)

210. Sergent, E., Foley, H. : Bull. Soc. path. exot., Paris, 1, 174, (1908)

211. Sergent, E., Foley, H. : Ann. Inst. Pasteur, Paris, 24, 337, (1910)

212.	Sergent, E., Gillot, V, Foley, H., Béguet, :	Compt. rend. Soc. Biol. 77, 226 (1914)
213.	Sergent, E., Foley, H. :	Compt.rend.Soc. Biol. 77, 261 (1914)
214.	Sergent, A, :	Bull. Soc.path.exot., Paris, 29, 245 (1936)
215.	Sergent, A. :	Bull. Acad.méd . 115, 463 (1936)
216.	Sergent, A. :	Ann. Inst. Pasteur, Paris, 61, 217 (1938)
217.	Smith, G.U. :	zit. n. Heisch (1950)
218.	Sparrow, H., Lumbroso, U, Lapidari, M. :	Arch. Inst. Pasteur. Tunis, 17, 279 (1928)
219.	Sparrow, H. :	Compt.rend . Acad.Sci, 239, 131 (1954)
220.	Sparrow, H. :	Bull. Soc.path.exot., Paris, 49, 630 (1956)
221.	Sparrow, H. :	Bull.World Health Organizat.N.Y. 19, 673 (1958)
222.	Sofieff, M.S. :	Arch.Schiffs.-Tropenhyg.34, 382 (1930)
223.	Stein, G.J. :	J.Exper.Med. 79, 115 (1944)
224.	Steiner, G., Steinfeld, J. :	Klin.Wschr. 4, 1995 (1925)
225.	Steiner, G., Steinfeld, J. :	Klin.Wschr. 5, 499 (1926)
226.	Strempel, R., Armuzzi, G. :	Klin.Wschr. 6, 62 (1927)
227.	Strempel, R., Armuzzi, G. :	Klin.Wschr. 6, 200 (1927)

228.	Strempel, R. :	Dtsch. med. Wschr. 54, 687 (1928)
229.	Schuhardt, V.T., Hemphill, E.G. :	Science, S, 422 (1946)
230.	Schuhardt, V.T., Wilkerson, M. :	J. Bact. 62, 215 (1951)
231.	Taft, W.C., Pike, J.B. :	Il. Amer. Med. Ass. 129, 1002 (1945)
232.	Topley, Wilson, G.S. :	Principles of Bacteriology and Immunity 2, 2017 (1955)
233.	Toyoda, H. :	Kitasato Arch. Exper. Med., Tokyo, 4, 40 (1921)
234.	Toyota, H. :	Kitasato Arch. Exper. Med., Tokyo, 3, 43 (1919)
235.	Trowell, H.C. :	East Afr. Med. J. 28, 402 (1951)
236.	Tucker, W.A.L. :	East Afr. Med. J. 23, 12 (1946)
237.	Tsun T'ung, Chung, H.L. :	Chin. Med. J. 54, Supp2, 315 (1938)
238.	Vaismann, A., Hamelin, A. :	Ann. Inst. Pasteur, Paris, 86, 107 (1954)
239.	Vaismann, A. et al. :	Ann. Inst. Pasteur, Paris, 84, 774 (1953)
240.	Vaismann, A. et. al. :	Ann. Inst. Pasteur, Paris, 88, 665 (1955)
241.	Virchow, R. :	Virchows Arch. path. Anat. 2, 143 (1849)
242.	Uhlenhuth, Haendel :	Arb. Gsd. amt. Berlin, 26, 1 (1907)
243.	Wainstein, A. :	Zschr. Immunitforsch. 60, 142 (1929)

244.	Weichbrodt, R. :	Dtsch. med. Wschr. 46, 678 (1920)
245.	Weyer, F., Mooser, M. :	Zschr. Tropenmed., Stuttgart, 8, 294 (1957)
246.	Wittebolle, P. :	Acta biol. Belg. 3, 190 (1943)
247.	Wittebolle, P. ; Baert, H. :	Acta biol. Belg. 3, 188 (1943)
248.	Wolmann, B., Wolman, M. :	Ann. Trop. Med., Liverpool, 39, 82 (1945)
249.	Wolstenholme, B., Gear, J. H. S. :	Transact. Roy, Soc. Trop. Med. 41, 513 (1948)
250.	Yano, M. :	Acta dermat. 29, 85 (1937)
251.	Yeo, R.M. :	S. Afr. Med. J. 24, 457 (1950)
252.	Zarafonetis, C. J. D., Ingraham H. S., Berry, J. D. :	J. immunol. 52, 189 (1946)
253.	Zimmermann, L. E.:	Amer. J. Publ. Health 43, 279 (1953)
254.	Zlatogoroff, :	Dtsch. med. Wschr. 49, 973 (1923)

Für die Möglichkeit, am Tropeninstitut zu arbeiten, danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. E. G. N a u c k.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. med. habil. H. L i p p e l t für die Überlassung des Themas und für die wertvollen Anregungen.

Herrn Dr. med. E i d m a n n danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten.

LEBENSLAUF

Am 23.April 1935 wurde ich als Sohn des Dr.med. Wilhelm Vinke und seiner Ehefrau Jutta, geborene Stubert in Berlin geboren.

Ich besuchte die Schulen in Berlin, Finsterwalde und Petershagen, wo ich an der Staatlichen Aufbauschule im März 1955 die Reifeprüfung ablegte.

Mein medizinisches Studium begann ich in Marburg. In Mainz bestand ich 1957 nach dem 5.Semester die ärztliche Vorprüfung. Die klinischen Semester belegte ich an den Universitäten Marburg, Wien, Hamburg und München. Das Staatsexamen legte ich im Februar 1961 in München ab.